

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

ESCUELA DE POSGRADO

PROGRAMA DOCTORAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**Determinación de compuestos fenólicos con capacidad
antioxidante en papa (*Solanum tuberosum* L.) nativa
variedad Huagalina de la Región La Libertad**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Autora: M.Sc. Carmen Rosa Rojas Padilla

Asesor: Dr. Víctor Vásquez Villalobos

Trujillo- Perú

2017

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Guillermo Alberto Linares Luján
PRESIDENTE

Dr. Viviano Paulino Ninaquispe Zare
SECRETARIO

Dr. Víctor Vásquez Villalobos
ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres que están en el cielo.

A mi esposo y a mis hijas, por la comprensión y el gran apoyo que me han brindado.

BIBLIOTECA DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme vida y salud, así como a mi familia.

Especial agradecimiento al Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV Viçosa (Brazil) y a la Agencia de Financiamiento por el apoyo financiero de los equipos utilizados en esta investigación (FINEP, CNPq, FAPEMIG)-2015

Se agradece al CIENCIACTIVA-CONCYTEC pues a través del proyecto MAGNET-Atracción de Investigadores, CONTRATO FONDECYT N° 008-2017, otorgado a la Pontificia Universidad Católica del Perú, se facilitó mi estadía por un año en las instalaciones PUCP, lo que permitió desarrollar los estudios de Resonancia Magnética Nuclear presentados en este trabajo. Asimismo, se agradece La Oficina de la Red Peruana de Universidades (RPU) y Entorno de la Dirección Académica de Relaciones Institucionales de la PUCP, por el apoyo logístico brindado durante la estadía.-2017

A mi asesor, Dr. Víctor Vásquez Villalobos por su entusiasmo, apoyo y acompañamiento para saltar las barreras en el camino y lograr los objetivos de esta investigación.

A la Dra. Helena Maruenda Castillo, por su paciencia, dedicación, preocupación constante por conectarme con la química. Es mi mejor ejemplo a seguir como investigadora de las ciencias.

Al Dr. Juan López, MSc. Ana Gonzales, MSc. Rodrigo Cabrera y Dr. José Carlos Ugaz, quienes me brindaron su incondicional apoyo.

A mi familia, que siempre me estuvieron alentando con sus palabras y sus oraciones.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 La papa <i>Solanum tuberosum</i> L.	3
I.1.2 Taxonomía	5
I.2 Composición química de <i>Solanum tuberosum</i> L.	7
I.2.1 Compuestos fenólicos	8
I.2.1.1. Ácidos fenólicos	10
I.2.1.2. Flavonoides	11
I.2.1.3. Flavonoles y flavonas	12
I.2.1.4. Flavononas	13
I.2.1.5. Isoflavonas	13
I.2.1.6. Antocianinas	13
I.2.1.7. Taninos	15
I.2.1.8. Taninos hidrolizables	15
I.2.1.9. Taninos condensados	15
I.2.1.10. Estilbenos y lignanos	15
I.2.2 Ácido fítico	17
I.3 Estudios metabolómicos	19
I.3.1 Resonancia Magnética Nuclear (NMR).....	21
I.3.2 Espectrometría de masas (MS)	24
I.3.3 Estudios químico- analítico en la <i>Solanum tuberosum</i> L.	29

II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
II.1 Objeto de Estudio	35
II.2 Instrumentación	36
II.3 Métodos y Técnicas	36
II.3.1 Materiales y Reactivos	36
II.3.2. Preparación de las muestras para LC-MS	37
II.3.3 Preparación de las muestras para el estudio de RMN- ³¹ P	38
II.3.4 Determinación de compuestos fenólicos en <i>S. tuberosum</i> L. mediante UPLC-MS/MS.	39
II.3.4.1 Análisis estadístico	40
II.3.5 Análisis mediante NMR de compuestos de fósforo en <i>S. tuberosum</i> L.	40
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
III.1 Estudio UPLC-MS/MS de <i>Solanum tuberosum</i> L.	42
III.2 Estudio NMR - ³¹ P de <i>Solanum tuberosum</i> L.	47
IV. CONCLUSIONES	55
V. PROPUESTA	57
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de papas cultivadas realizadas por diferentes autores.....	6
Tabla 2.	Compuestos nutricionales y funcionales en papa.....	7
Tabla 3.	Técnicas metabolómicas utilizadas para la cuantificación de compuestos bioactivos en <i>Solanum tuberosum</i> L.	31
Tabla 4.	Estudios de RMN en <i>Solanum tuberosum</i> L	33
Tabla 5.	Curvas de calibración UPLC-MS-MS de metabolitos de interés.	43
Tabla 6.	Contenido ^a de fitato, glicerol fosfato y fosfato en papa expresado en g/100 g masa seca.....	52

BIBLIOTECA DE POSGRADO

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de compuestos fenólicos	9
Figura 2. Ácidos hidroxibenzoicos	10
Figura 3. Ácidos hidroxicinámicos	11
Figura 4. Flavonoides	12
Figura 5. Antocianinas	14
Figura 6. Trans-resveratrol	16
Figura 7. Lignanos	17
Figura 8. Estructura del inositol 1, 2, 3,4,5,6 hexakisfosfato (Ins P6)	18
Figura 9. Estrategias experimentales para la elaboración de perfiles de metabolitos de bajo peso molecular en sistemas biológicos.	20
Figura 10. Pasos involucrados en un estudio de metabolómica basada en NMR.	22
Figura 11. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú (Cortesía del CERMN- PUCP, foto tomada por el Dr. José Carlos Ugaz Peña.....	23
Figura 12. Esquema del sector magnético de un Espectrómetro de Masas.	25
Figura 13. Sistema alternativos HPLC/UPLC acoplado a MS / UV-Vis / NMR.	27
Figura 14. Diferencias entre HPLC y UPLC.	28
Figura 15. Compuestos fenólicos en papa nativa Huagalina	44
Figura 16. ACP de compuestos fenólicos en cáscara y pulpa de papa Huagalina	47
Figura 17. Espectro NMR- 31 P de ácido fítico	48
Figura 18. Espectro de NMR-31P- (Fosfato, glicerol fosfato y fitato) de A) Pulpa y B) Cáscara de papa Huagalina	50
Figura 19. Espectro de NMR - 31P (Fosfato, glicerol fosfato y fitato) de C) Pulpa y D) Cáscara de papa Canchan	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Por simplicidad las abreviaturas se encuentran en idioma inglés

DAD	Detector de arreglo de diodos
GC-MS	Cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas
HPLC- DAD- MS	Cromatografía líquida de alta eficacia con detector arreglo de diodos acoplada a espectrómetro de masas
LC- MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas
MS	Espectrómetro de masas
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
qNMR	Resonancia Magnética Nuclear cuantitativa
HRNMR	Resonancia Magnética con giro de ángulo de alta resolución
UPLC- MS/MS-	Cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a espectrómetro de masas
UPLC-Q- TOF- MS	Cromatografía líquida de ultra eficacia con analizador de tiempo de vuelo acoplada a espectrómetro de masas
UPLC-DAD- MS-	Cromatografía líquida de ultra eficacia con detector de arreglo de diodos acoplada a espectrómetro de masas
UPLC- DAD-ESI-MS	Cromatografía líquida de ultra eficacia con detector de arreglo de diodos con ionización electrospray acoplada a espectrómetro de masas.
UV- VIS	Ultravioleta visible

RESUMEN

En esta investigación se evaluó los compuestos fenólicos en pulpa y cáscara mediante la metodología UPLC-MS/MS de papa nativa Huagalina de dos localidades de Santiago de Chuco (Región La Libertad) y ^{31}P NMR para la evaluación preliminar de ácido fítico, de papa nativa Huagalina cultivada en la zona de Julcán (Región La Libertad) y se comparó con papa comercial Canchan. Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó metanol, agua Milli Q y ácido acético y para los fosfatos (fosfatos, glicerol fosfato y ácido fítico) se utilizó NaOH 1M, agua Milli Q y EDTA 0.1 M.

Quince (15) compuestos fenólicos fueron identificados en el estudio MS/MS; cuatro (4) resaltan por encontrarse en mayor concentración (mg/100g ms): Ácido clorogénico (510.55 ± 25.04 y 376.81 ± 3.14), ácido neoclorogénico (32.48 ± 2.066 y 99.10 ± 0.58), ácido cafeico (81.61 ± 2.89 y 69.24 ± 1.90) y vainillina (12.18 ± 0.74 y 8.9 ± 0.07), de las 2 localidades estudiadas. No se detectó genisteína ni 7-hidroxiflavona y se detectaron 9 metabolitos de concentración menor a 1 mg/100 g ms. Mediante el Análisis de Componentes Principales se determinó que la mayor correlación de metabolitos se encuentra en la cascara que en la pulpa.

Los resultados obtenidos en NMR son de dos tipos: se ha implementado por primera vez un método para extraer y cuantificar ácido fítico en pulpa y cáscara de papa mediante ^{31}P NMR, método de extracción que no ha sido aún optimizado; y la cuantificación preliminar de fósforo total es mayor (g/100g ms) en la papa Canchan (0.681), que la papa Huagalina (0.306). En particular, resalta el contenido de fitato de la pulpa de la papa Canchan (0.078 g/100 g ms) en comparación de la pulpa de Huagalina (0.035 g/100 g ms). En otras investigaciones se ha determinado ácido fítico, a través de métodos distintos de extracción y detección y dada estas diferencias cualquier análisis resulta infructuoso.

Palabras clave: papa nativa, compuestos fenólicos antioxidante, anticancerígeno, salud humana.

ABSTRACT

In this research, the UPLC-MS / MS methodology was used to evaluate the phenolic compounds in Huagalina native potato (pulp and peel) from two locations in Santiago de Chuco- (La Libertad Region) and ^{31}P NMR was used for the preliminary evaluation of phytic acid, of native potato Huagalina grown in Julcan area (La Libertad Region) and commercial potato Canchan. The extraction of phenolic compounds was carried out with methanol, Milli Q water and acetic acid, whereas extraction of phosphates was carried out with NaOH 1M, Milli Q water and EDTA 0.1 M.

Fifteen (15) phenolic compounds were identified in the MS / MS study, four (4) metabolites were highlighted by its high concentrations (mg/100g DW): Chlorogenic acid (510.55 ± 25.04 and 376.81 ± 3.14) neochlorogenic acid (32.48 ± 2.066 and 99.10 ± 0.58), caffeic acid (81.61 ± 2.89 and 69.24 ± 1.90) and vanillin (12.18 ± 0.74 and 8.9 ± 0.07), from the two locations studied. No genistein neither 7-hydroxyflavone was detected. Nine (9) metabolites were detected with concentrations less than 1 mg / 100 g DW. By Principal Components Analysis, it was determined that the highest correlation of metabolites was found in the peel than in the pulp.

The results obtained by NMR are of two types: a method for extracting and quantifying phytic acid in potato peel and pulp has been implemented for the first time by ^{31}P NMR, it that has not been optimized yet. Preliminary quantification of total phosphorus (g/100 g ms) from Canchan potato (0.681), contains a greater total amount of phosphorus than the Huagalina potato (0.306).

In particular, highlighted the phytate content from Canchan potato pulp (0.078 g / 100 g DW) versus Huagalina pulp (0.035 g / 100 g DW). The determination of phytic acid in potato has been reported in others research through different methods of extraction and detection, because of this any analysis will be unsuccessful.

Keywords: potato landraces, phenolic compounds, antioxidant, anticancer, human health.

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los más importantes cultivos con que cuenta el ser humano, que se originó en los andes del sur del Perú (Spooner *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2007) y se convirtió en fuente de alimento para todo el mundo. Se ubica en el cuarto puesto como alimento básico agrícola después del arroz, de la cebada, y el trigo (Bianeth & Restrepo, 2013). La papa proporciona buena fuente de proteínas, carbohidratos, vitamina C, vitamina B6 y vitamina B3 y minerales como potasio, fósforo y magnesio (André *et al.*, 2009). Este tubérculo es también fuente importante de compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides que son los tres mayores grupos de metabolitos secundarios (Hawkes, 1990), siendo los polifenoles los que tiene efectos positivos sobre la salud humana (Navarre, 2009; Monro & Mishra, 2009) que están involucradas en la patogénesis de la vejez y muchas enfermedades degenerativas (Virgili & Scaccini, 2003; Kris-Etherton *et al.*, 2004). También se encuentran otros compuestos entre los cuales están los fitatos que son sales del ácido fítico, químicamente conocido como Inositol-hexakisfosfato (InsP6). Por décadas, el ácido fítico en forma de sal o sea los fitatos han sido vistos como anti-nutrientes pero en los últimos años se ha encontrado propiedades benéficas a los fitatos para la salud humana como antioxidante y anticancerígeno (Schlemmer *et al.*, 2009).

La metabolómica es una técnica moderna y fiable que actualmente se ha utilizado muy poco para papas nativas mientras la mayoría de investigaciones se han realizado con papas comerciales. Las diversas variedades de cultivos de papas nativas se encuentran en la zona Andina de América (Hijmans, 2003); y siendo el Perú el lugar donde se originó las papas y la diversidad de condiciones naturales

que posee, le otorgan una importante riqueza biológica generando ventajas con las papas nativas que se cultivan sobre los 3 mil m.s.n.m. y que no han sido estudiadas en las características químicas de sus compuestos bioactivos. En nuestro país existen alrededor de 2500 tipos diferentes de papas nativas y en la actualidad solo hay 2 trabajos publicados con papas nativas: (André *et al.*, 2009; Buono *et al.*, 2013) con técnicas *in vitro* para determinar capacidad oxidante total y la técnica convencional de HPLC para la identificación de compuestos fenólicos.

La papa es uno de los principales cultivos del Perú tanto por las hectáreas sembradas como por la población dedicada al cultivo, después del maíz es el segundo cultivo en importancia (Álvarez, 2001). En la región de La Libertad, el cultivo de papa es el segundo cultivo transitorio en importancia de superficie cultivada con sólo el 15.3% de la superficie cultivada total, la mayor superficie cultivada lo ocupa la caña de azúcar con 37.6% del total. La importancia del cultivo de la papa de acuerdo a lo que reporta el IV Censo Nacional Agropecuario del 2012 (INEI, 2013) es que se dedican al cultivo de la papa 38,342 productores, mientras que a la caña de azúcar lo hacen sólo 3,142 productores. La actividad agrícola en la sierra de La Libertad tiene un gran impacto en la población, en donde la tasa de desnutrición es elevada, en la Provincia de Sánchez Carrión y en Otuzco para citar a los más importantes, la desnutrición en sus distritos es del orden 59 a 65% y 44 a 68 % respectivamente (Neciosup, 2009)

La papa nativa Huagalina, también llamada “Amarilla del Norte” posee características morfológicas y nutritivas que la hacen ideal para el consumo directo y es muy bien aceptada por los consumidores.

Es importante la exploración de oportunidades del desarrollo de papas nativas y el mejoramiento de su cultivo, a partir de la premisa que el desarrollo del mercado de productos con importante valor funcional en la dieta de la población, demostrado científicamente por técnicas modernas respalden la funcionalidad que se conoce en forma empírica para curar ciertas dolencias, y que pueda constituirse en una fortaleza para la conservación de la biodiversidad y ser uno de los pilares para el desarrollo estratégico de la sierra andina y de sus productores, que son los campesinos más pobres del país. También ayudaría a mejorar la calidad de vida de la humanidad conociendo los fitoquímicos que posee este tubérculo que podría prevenir enfermedades degenerativas y también conocer si es que posee anti-nutrientes. Esto ayudaría a mejorar los valores del justiprecio de la papa nativa, que inciden directamente en los ingresos de los agricultores de la sierra de La Libertad.

El objetivo de este trabajo fue identificar y cuantificar los compuestos fenólicos y el ácido fitico en *Solanum tuberosum* L. nativa variedad Huagalina mediante técnicas metabólicas UPLC- MS/MS y NMR respectivamente.

1.1 La papa *Solanum tuberosum* L.

La familia Solanaceae está comprendida por 3000- 4000 especies y con alrededor de 90 géneros, entre estos: papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*S. lycopersicum* L.), berenjena (*S. melongena* L.), ají picante (*Capsicum*, sp) son los más conocidos cultivos de la familia Solanaceae (Machida-Hirano, 2015).

Solanum tuberosum L. es cultivada bajo amplio rango de condiciones geográficas (altitud, latitud y clima) que cualquier otro cultivo importante, su cultivo es muy

eficiente porque produce mayor cantidad de materia seca, proteína y minerales por hectárea que la mejor cosecha de cereales; (Buono *et al.*, 2013; Ezequiel *et al.*, 2013). Según FAOSTAT (2014), la producción mundial de papa ha llegado a 382 millones de TM y China sigue siendo el mayor productor (95 millones TM) siguiéndole India (46 millones TM), Rusia (31 millones TM), USA (20 millones TM) y el Perú cultivó 5 millones TM. El consumo en China fue de 40 Kg/pers/año; en India 24 Kg/pers/año; en la Federación Rusa 130 Kg/pers/año; en USA 60 Kg/pers/año y en el Perú se llegó a 85 Kg/pers/año. Estos datos reflejan la importancia de su cultivo puesto que este tubérculo es considerado mundialmente un alimento básico.

I.1.1 Origen de la papa

El cultivo de papa *Solanum tuberosum* L. remonta su origen en las variedades de papas nativas de los Andes, desde el oeste de Venezuela hasta el norte de Argentina y el sur de Chile cultivadas por agricultores pre-colombinos. Las papas andinas mostraron diversidad morfológica y genética. Las especies silvestres que dieron lugar a estas variedades ha sido un tema de discusión, pero todas las hipótesis se centran en un grupo de aproximadamente de 20 tubérculos similares morfológicamente (*Solanum* sección Petota). Mediante análisis filogenético y análisis de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado llegaron a descubrir que, en contraste con anteriores hipótesis, estas especies: i) mostraban un origen monofilético ii) las especies silvestres progenitores provenían de un grupo muy similar de especies silvestres clasificadas como el complejo *S. brevicaulis* iii) las papas nativas tenían su origen en los andes del sur del Perú (Brush *et al.*, 1995; Spooner *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2007).

I.1.2 Taxonomía

La clasificación de la papa nativa ha sido muy controversial. Buskanov (1971) y Lechnovic (1971) clasificaron la papa nativa en 21 especies; Hawkes (1990) hizo la clasificación en 7 especies y en 7 subespecies; Ochoa (1990) y Ochoa (1999) clasificaron en 9 especies con 2 sub especies y Huaman & Spooner (2002) hicieron la clasificación en 8 grupos de cultivares definidos por el usuario. Si bien el número de juegos completos de cromosomas (ploidía) es un factor principal en la clasificación del cultivo de papas, pero sus resultados muestran muchas excepciones considerándose una característica deficiente para definir los grupos genéticos. Spooner *et al.* (2007) re-examinaron las categorías de clasificación de las papas nativas utilizando marcadores nucleares SSR (Secuencias Simples Repetidas) complementados con perfiles de ADN desarrollados para una óptima utilidad en *S.tuberosum* teniendo en cuenta el polimorfismo, grados de calidad y la genómica. Según Machida-Hirano (2015) el aporte más reciente de clasificación ha sido realizada por Spooner *et al.*, (2007), quienes trabajaron con 742 papas nativas de todas las especies cultivadas y especies silvestres de la cual provenían, siguiendo la técnica detallada anteriormente y sugirieron la clasificación en 4 especies:

- i) *S. tuberosum* con 2 grupos de cultivo:
 - Grupo Andigenum de los genotipos andinos (altitudes altas) que contienen diploides, triploides y tetraploides.
 - Grupo Chilotanum de bajas altitudes y tetraploides de papas nativas chilenas.

- ii) *S. ajanhuiri* (diploide)
- iii) *S. juzepczuki* (triploide)
- iv) *S. curtilobum* (pentaploide)

En la Tabla 1, este autor reporta una síntesis de las clasificaciones realizadas por Hawkes (1990), Ochoa (1990, 1999) y Spooner *et al.*, (2007), resaltando la diferencia que existe con la clasificación de Hawkes (1990) que es la más utilizada en la base de datos de entidades internacionales. Spooner *et al.*, (2007) sugieren la clasificación en las 4 especies ya mencionadas y las especies que han sido listadas anteriormente como independientes (*S. chaucha*, *S. phureja*, *S. stenotomum*) sugieren considerarlas en *S. tuberosum* Grupo Andigenum, basado en su morfología y su evidencia molecular siguiendo las pautas del *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de papas cultivadas realizadas por diferentes autores.

Hawkes (1990)	Ochoa (1990-1999)	Spooner et al. (2007)
<i>Solanum ajanhuiri</i>	<i>S. x ajanhuiri</i>	<i>S. ajanhuiri</i>
<i>S. curtilobum</i>	<i>S. x curtilobum</i>	<i>S. curtilobum</i>
<i>S. juzepczuki</i>	<i>S. x juzepczukii</i>	<i>S. juzepczukii</i>
<i>S. tuberosum</i> Subsp. <i>andigena</i> Hawkes Subsp. <i>tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i> Subsp. <i>andigena</i> Hawkes Subsp. <i>tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Andigenum Grupo Chilotanum
<i>S. chaucha</i>	<i>S. hygrothermicum</i>	<i>S. tuberosum</i> (Grupo Andigenum)
<i>S. phureja</i>	<i>S. x Chaucha</i> <i>S. phureja</i>	<i>S. tuberosum</i> (Grupo Andigenum)
<i>S. stenotomum</i>	<i>S. stenotomum</i> <i>S. geniocalys</i>	<i>S. tuberosum</i> (Grupo Andigenum)

Fuente: Machida- Hirano (2015)

I.2 Composición química de *Solanum tuberosum* L.

La papa es reconocida como una fuente de alta calidad de proteínas, carbohidratos, vitamina C, vitamina B6, vitamina B3 y minerales como potasio, fósforo y magnesio (Subar *et al.*, 1998). Cuando se consume en forma de alimento completo su contenido calórico es similar a las leguminosas por lo cual es una fuente barata de energía (Camire *et al.*, 2009).

Tabla 2. Compuestos nutricionales y funcionales en papa

Parámetro	Unidad	Cantidad
Materia seca	g/100 g ms	16-34
Almidón	g/100 g ms	60-73
Proteína	g/100 g ms	4-14
Ácido ascórbico	mg/100 g ms	40- 182
Glicoalcaloides	mg/100 g ms	18-550
Comp. Fenólicos	mg GA/100 ms	92-340
(Folin Ciocalteu)	mg ac. clorogénico/100 gms	279-240
Comp. Fenólicos por HPLC	mg/100 ms	27-527

Fuente: Narváez- Cuenca (2013)

Con respecto a la papa nativa Huagalina se sabe que el tubérculo completo (pulpa y cáscara) contiene 77.9 % de agua; 2.4 % de proteína; grasa total 0.2 %; carbohidratos totales 18.3 %; carbohidratos disponibles 11.2 %, fibra dietaria 7.1 % y cenizas 1.2 % (MINSA, 2009). Además de este tipo de

compuestos, se encuentran metabolitos secundarios que son compuestos fenólicos antioxidantes diversos como el ácido clorogénico y sus isómeros, ácido cafeico, vainillina, ácido sirínico, etc.; glicoalcaloides como α -chaconina y α -solanina, ácido fítico y otros fitoquímicos (Morris *et al.*, 2004). Estos compuestos son biosintetizados en células o tejidos específicos, almacenados en otros tejidos y luego transferidos vía el floema o xilema a un almacenamiento final (Wink, 2010); tienen una función esencial en las plantas que las protege del estrés abiótico (medio ambiente extremos, metales pesados, etc) y estrés biótico (insectos, hongos y microbios).

Los compuestos antioxidantes en la dieta son definidos por la Food and Nutrition Board of the National Academy of Science (National Academy of Science, 1998) como las sustancias alimenticias que pueden significativamente disminuir el efecto adverso de las especies reactivas de oxígeno (EROS) y las especies reactivas del Nitrógeno (ERN) en la función fisiológica normal en humanos. Es importante recalcar que los metabolitos secundarios de las plantas ejercen una variedad de funciones de antioxidantes debido a su amplia variedad de estructuras y el beneficio de consumirlos viene del efecto sinérgico y aditivo de los múltiples metabolitos secundarios que complementan sus actividades antioxidantes (Lovat *et al.*, 2015).

1.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de moléculas cuya estructura base es un sistema aromático del cual penden grupos funcionales hidroxilo. Los polifenoles se dividen en varias clases de acuerdo

con el número de anillos fenólicos y a los elementos estructurales que se unen a estos anillos unos a otros (D'Archivio *et al.*, 2007). En la Figura 1 se detalla la clasificación de compuestos fenólicos según Shahidi y Ambigaipalan, (2015).

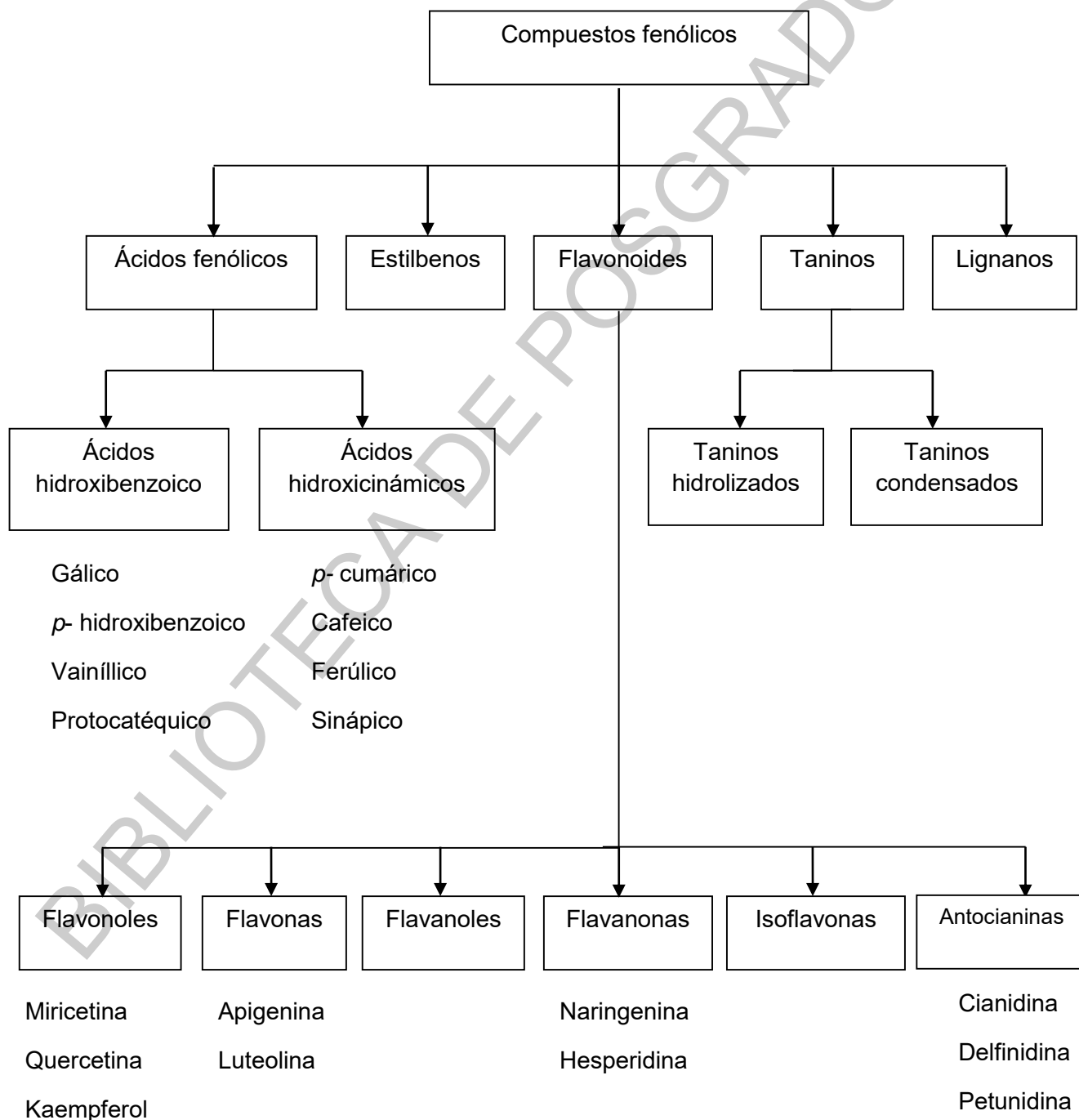


Figura 1. Clasificación de compuestos fenólicos según Shahidi y Ambigaipalan, (2015).

I.2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal, la mayoría de ellos son una parte integral de la dieta humana. Los derivados sustituidos del ácido hidroxibenzoico (Figura 2) y del ácido hidroxicinámicos (Figuras 3), son los ácidos fenólicos predominantes en las plantas, siendo el segundo grupo más común que el primero (Mattila & Hellstrom, 2007). Dentro de los ácidos hidroxicinámicos resaltan el ácido cafeico, *p*-cumárico y ferúlico, con frecuencia hallados como ésteres del ácido quínico, el ácido clorogénico, por ejemplo. En el caso de los ácidos hidroxibenzoicos, éstos mayormente se encuentran en la naturaleza como glucósidos (Mattila & Hellstrom, 2007; Shahidi & Chandrasekara, 2010; Shahidi *et al.*, 2008; Yeo & Shahidi, 2015)

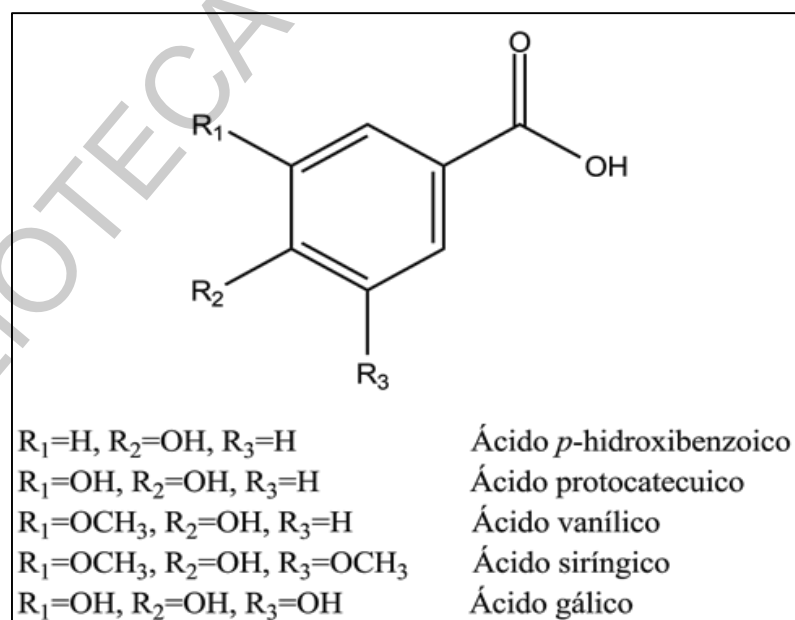


Figura 2. Estructuras de algunos ácidos hidrobenczoicos

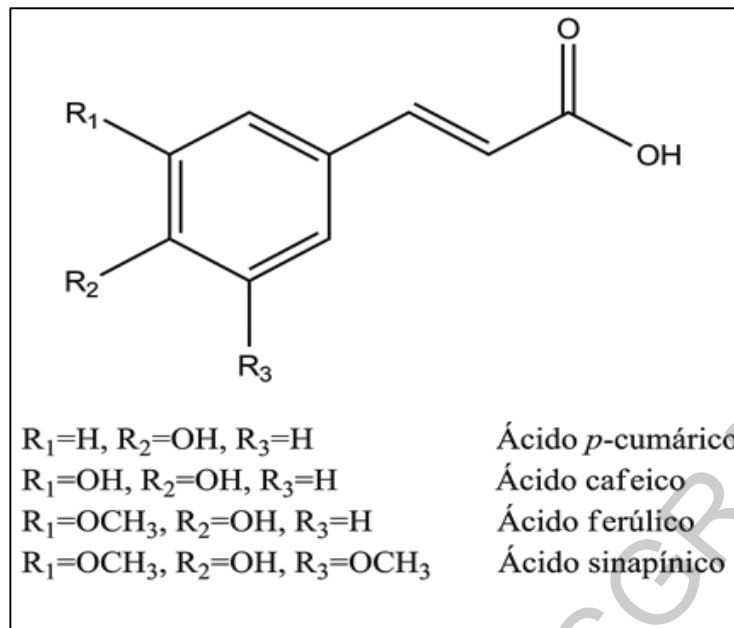


Figura 3. Estructuras de algunos ácidos hidroxicinámicos

I.2.1.2. Flavonoides

Aproximadamente 4000 flavonoides han sido identificados hasta el momento en el reino vegetal. Este grupo se puede clasificar en antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y flavonoles (Tsao & Yang, 2003). (Figura 4)

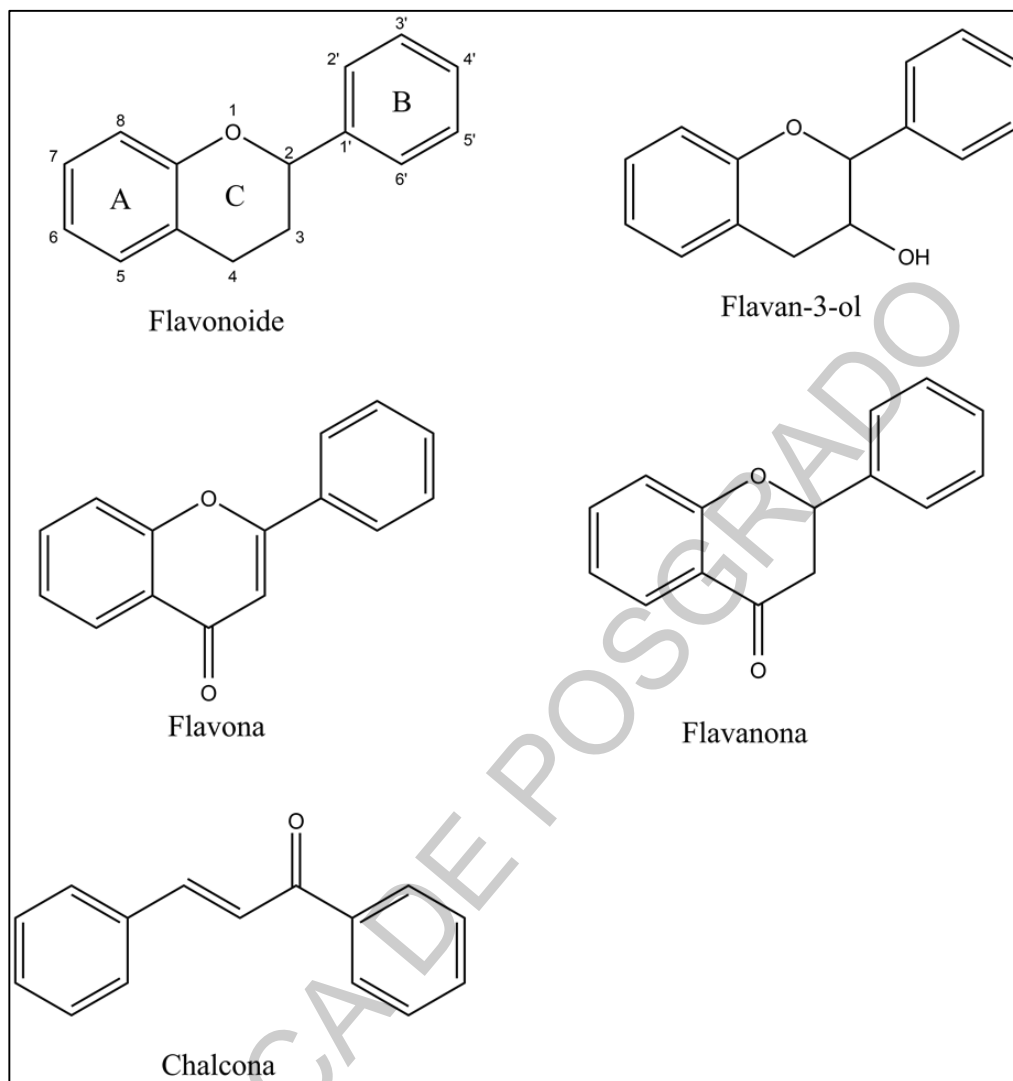


Figura 4. Estructura general de diversos tipos de flavonoides

I.2.1.3. Flavonoles y flavonas

Los flavonoles y flavonas se producen como agliconas en los alimentos, aproximadamente son 200, entre flavonoles y flavonas, de las cuales 100 se han identificado en plantas (Shahidi & Naczki, 2004). Los flavonoles están representados principalmente por la quercetina, kaempferol y miricetina. Las flavonas, en cambio por apigenina y luteolina. Chu *et al.*, (2000) reportaron

que los niveles de flavonas fueron más altos que los de flavonoles en todos los vegetales del género *Brassica*.

I.2.1.4. Flavononas

Las flavononas están presentes en altas concentraciones en los cítricos, también se pueden encontrar en tomates y en plantas aromáticas como la menta. Las principales agliconas son naringenina, hesperidina y eriodictiol (Ignat *et al.*, 2011)

I.2.1.5. Isoflavonas

Las isoflavonas son fitoquímicas que se encuentran en muchas plantas y alimentos de origen vegetal tanto como agliconas como en su forma acetyl o malonil, β -glucósida entre otras posibilidades.. Tienen efectos importantes para la salud, para la prevención de enfermedades tales como la aterosclerosis o el cáncer. Algunos de los efectos fisiológicos se atribuyen a sus similitudes estructurales con los β -estradiolos y por ello son, en ocasiones, denominados “fitoestrógenos” (Klejdus *et al.*, 2007; D'Archivio *et al.*, 2007)

I.2.1.6. Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua vacuolar que pueden aparecer como rojo, púrpura o azul en función del pH. La alta solubilidad en agua de estos compuestos permite su fácil incorporación en los sistemas de alimentos acuosos (Kammerer *et al.*, 2004). Se puede encontrar antocianinas en todos los tejidos vegetales, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores y frutos. Pueden actuar como antioxidantes mediante la donación de hidrógeno a los

radicales altamente reactivos, evitando de este modo aún más la formación de radicales libres (Iversen, 1999). Su potencial antioxidante depende del número y disposición de los grupos hidroxilo y el grado de conjugación estructural, así como la presencia de aceptores y donantes de electrones en la estructura del anillo (Lapornik *et al.*, 2005; Konczak & Zhang, 2004). Seis antocianidinas se presentan con mayor frecuencia en las plantas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina (Figura 5). Los azúcares comúnmente vinculados a las antocianidinas son monosacáridos (glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa) y di o trisacáridos formado por combinación de los cuatro monosacáridos (Bureau *et al.*, 2009).

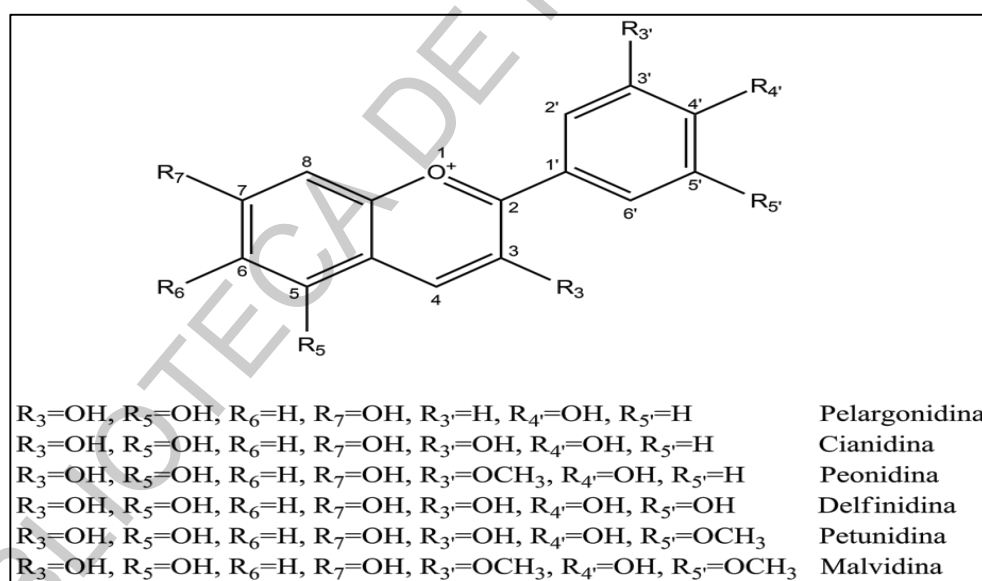


Figura 5. Estructura de algunas antocianinas

I.2.1.7. Taninos

Los taninos son compuestos que contienen gran número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales, razón por la cual son capaces de enlazarse a proteínas y a otras moléculas. Se pueden clasificar en dos categorías: taninos hidrolizables y taninos condensados (Shahidi & Naczk, 2004)

I.2.1.8. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son derivados del ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico). El ácido gálico se esterifica a un poliol y los grupos galoil puede ser esterificados adicionalmente u oxidativamente para producir taninos hidrolizables más complejos (Hagerman, 2002).

I.2.1.9. Taninos condensados

Los taninos condensados o proantocianidinas son compuestos oligoméricos y polímeros de flavonoides, específicamente de los flavan-3-oles (Ferreira & Li, 2000; Khanbabaee & Ree, 2001). Los grupos fenólicos de los taninos se unen muy fuertemente con el grupo -NH de péptidos y proteínas, que impiden su hidrólisis y la digestión en el estómago y por tanto se sabe que son anti- nutricionales en la naturaleza (Shahidi & Naczk, 2004).

I.2.1.10. Estilbenos y lignanos

Los estilbenos, en particular, trans-resveratrol (Figura 6) y su glucósido, son beneficiosos para la salud, pues gozan de propiedades antioxidantes, antitumorales y anticancerígenas (Jung *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2010). El

principal estilbeno dentro de nuestra dieta es el resveratrol presente en el vino y en el cacahuate rojo (Burns *et al.*, 2002) y en menores cantidades en la col roja, espinacas y ciertas hierbas (Jaganath & Crozier, 2010).

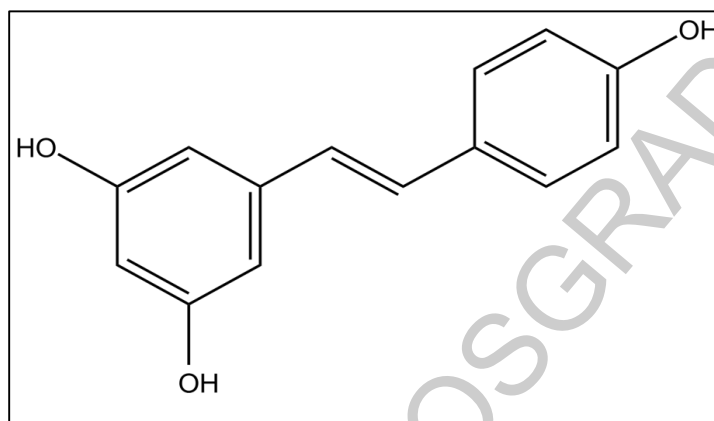


Figura 6. Trans-resveratrol

Los lignanos son producidos por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropanos; que están en su mayoría presentes en la naturaleza en forma libre, o como glucósidos. El interés en lignanos y sus derivados sintéticos está creciendo debido a sus aplicaciones en la quimioterapia del cáncer y varios otros efectos farmacológicos (Saleem *et al.*, 2005) (Figura 7)

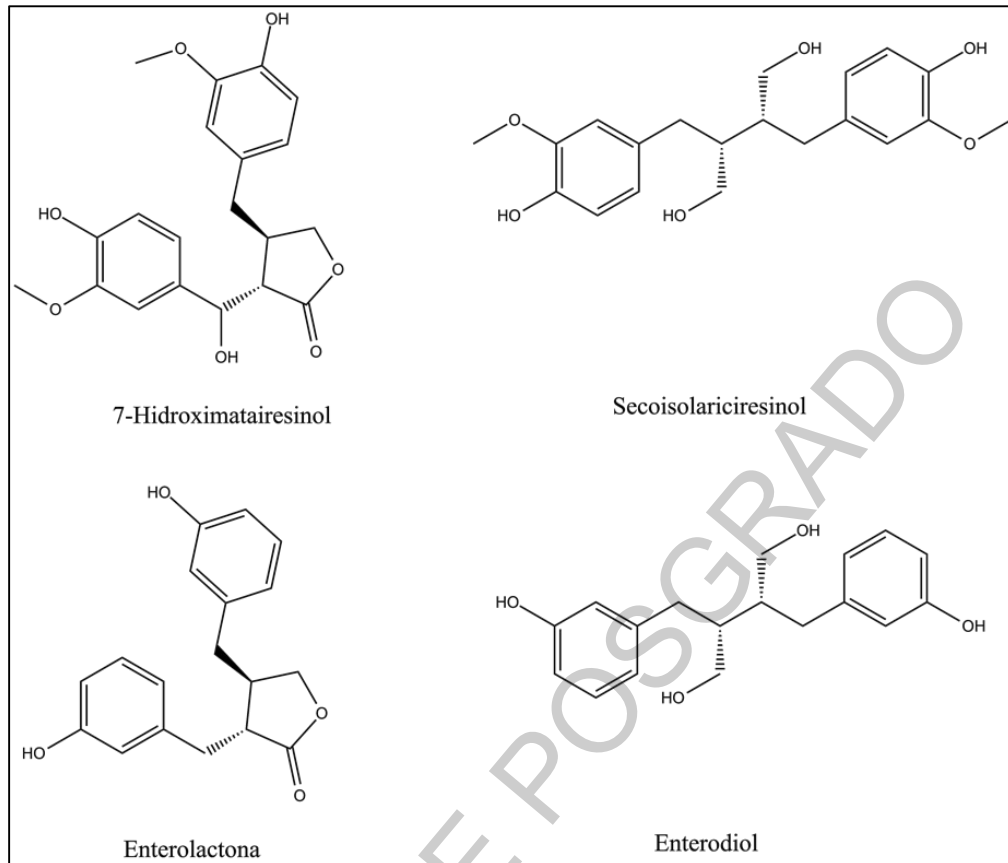


Figura 7. Lignanos

I.2.2 Ácido fítico

El ácido fítico químicamente conocido como inositol hexakisfosfato (InsP6) y sus sales se denominan fitatos. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en semillas, raíces y tubérculos cumpliendo una misma función, la de almacenar fuente de fosfato para el proceso de germinación y crecimiento (Schlemmer *et al.*, 2009).

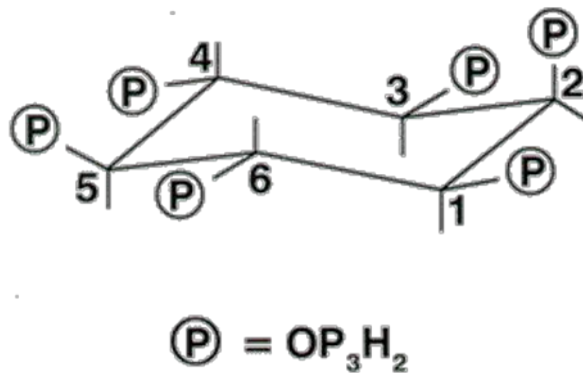


Figura 8. Estructura del inositol 1, 2, 3,4,5,6 hexakisfosfato (Ins P6) (Raboy, 2003)

Por décadas han sido vistos como anti-nutrientes pues durante su pasaje gastrointestinal puede inhibir la absorción de algunos oligoelementos y minerales esenciales que puede causar deficiencia de hierro, calcio y zinc (McCance & Widdowson, 1942; Prasad *et al.*, 1963). Otro aspecto negativo se encuentra asociado con la formación de un complejo muy fuerte entre algunas proteínas y el fitato, altamente resistente a la proteólisis independientemente del pH (Cheryan, 1980). Hasta el momento el efecto de complejo fitato-proteína en la nutrición humana no ha sido elucidado (Kumar *et al.*, 2010).

Asimismo, desde hace 30 años, se le atribuye propiedades benéficas a los fitatos como antioxidante, anticancerígeno, inhibidor de sales de calcio (piedras renales) disminución del índice glicémico y positivos efectos en disminuir el colesterol en sangre (Graf *et al.*, 1987; Shamsuddin, 1995; Grasses & Costa- Bauza, 1999 ; Thompson *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 2006).

Debido a que las papas introducen a través de su consumo diario a una cantidad importante de fitatos, es necesario investigar las consecuencias nutricionales de su consumo en humanos.

I.3 Estudios metabolómicos

La metabolómica ha sido definida como el campo de investigación que comprende la caracterización de una completa colección de pequeñas moléculas (peso molecular menor a 2 kilodaltons) en un sistema biológico (Wishart *et al.*, 2013). La metabolómica se encuentra asociada al estudio comprensivo y cuantitativo de los metabolitos en un sistema biológico relacionadas con la genética y perturbaciones externas (Lindon & Nicholson, 2014; Kim *et al.*, 2011).

Los alimentos derivados de plantas son una fuente diversa de metabolitos secundarios, compuestos químicos de bajo peso molecular que, aunque no se encuentran directamente relacionados con el crecimiento y el desarrollo de la planta, están implicados en diversas de sus actividades. Entre estos se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, alcaloides y compuestos sulfurados, todos ellos con propiedades químicas muy distintas (Johanningsmeier *et al.*, 2016).

Los criterios establecidos en los estudios metabolómicos indican que la preparación de la muestra, el método analítico y el análisis de los datos elegidos deben permitir abarcar a la mayor clase de compuestos posibles. La metodología elegida debe ser robusta, sensible, reproducible, de alta recuperación, independiente de la matriz y debe contar con un método estadístico multivariable que facilite el análisis de la gran cantidad de datos (Fiehn, 2001). Sin embargo, dada el amplio rango dinámico y químico de los metabolitos de bajo peso molecular en mezclas biológicas, no es posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola plataforma

analítica (Glassbrook & Ryals, 2001) y por ello, por lo general, se emplean técnicas analíticas diversas y complementarias, dentro las que resaltan la Espectrometría de Masas: *Mass Spectrometry* (MS) y la Resonancia Magnética Nuclear: *Nuclear Magnetic Resonance* - (NMR). La NMR destaca por la capacidad que tiene la técnica de proporcionar información clave para dilucidar las estructuras de los distintos metabolitos que conforman una mezcla compleja, mientras que la espectrometría de masas, por su lado, permite obtener la masa expresada como masa/carga, de cada uno de los metabolitos presente en dicha mezcla. Ambas técnicas facilitan la obtención de un perfil espectral que refleja el estado metabólico del organismo en estudio. Puesto que los perfiles metabólicos son complejos su interpretación requiere el empleo de potentes métodos bioinformáticos y estadísticos (Figura 9).

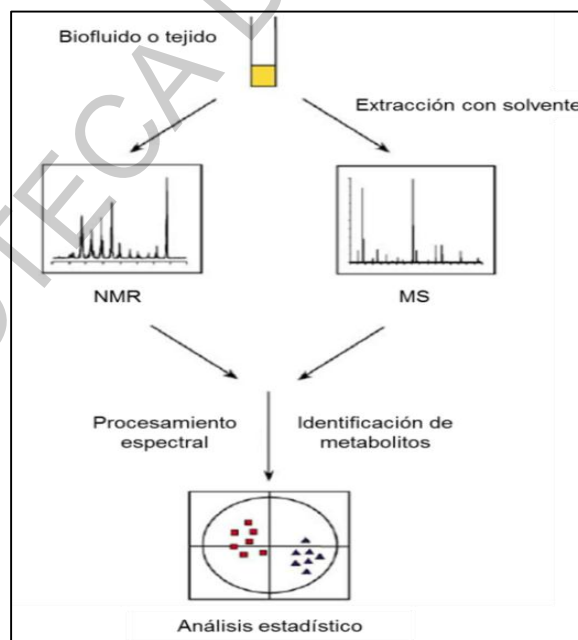


Figura 9. Estrategias experimentales para la elaboración de perfiles de metabolitos de bajo peso molecular en sistemas biológicos.

Fuente: Whitfield *et al.* 2004

I.3.1 Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

La NMR es la técnica preferida para obtener perfiles metabolómicos, pues tanto la preparación de la muestra como la obtención del espectro son procesos rápidos y relativamente simples (Kim *et al.*, 2011; Krishnan *et al.*, 2005). Otra de las grandes ventajas de la NMR es que las señales del espectro, bajo condiciones adecuadas, son proporcionales a la concentración molar del compuesto permitiendo la directa comparación de la concentración de cada compuesto en mezcla sin requerir curvas de calibración. Al emplear un estándar interno de concentración conocida se puede estimar la concentración absoluta de todos los metabolitos identificados en la mezcla. El análisis de NMR se basa en el comportamiento (relajación) de los núcleos activos de determinados elementos como el ^1H (Hidrógeno) y el ^{13}C (Carbono13) bajo un campo magnético (Bo) y frente a un pulso de Radio Frecuencia (RF) dado. La relajación describe un proceso complejo que se inicia a partir de la división de los niveles de espín nuclear (efecto *Zeeman*) por acción del campo magnético Bo aplicado y de la excitación de los núcleos por absorción de RF, los cuales, una vez removido el pulso de RF, tienden al equilibrio (Novoa-Carballal *et al.*, 2011). Esta técnica permite identificar y cuantificar simultáneamente una amplia gama de compuestos orgánicos en el rango micromolar y proporcionar información imparcial sobre perfiles de metabolitos. La metabolómica basada en NMR es capaz de proporcionar una ‘visión holística’ de los metabolitos bajo ciertas condiciones y de esta forma es ventajosa su utilización. En este sentido ha sido ampliamente utilizada para el análisis de huella metabólica

(*fingerprinting*), análisis de perfiles y flujo metabólico (Wu *et al.*, 2010). (Figura 10)

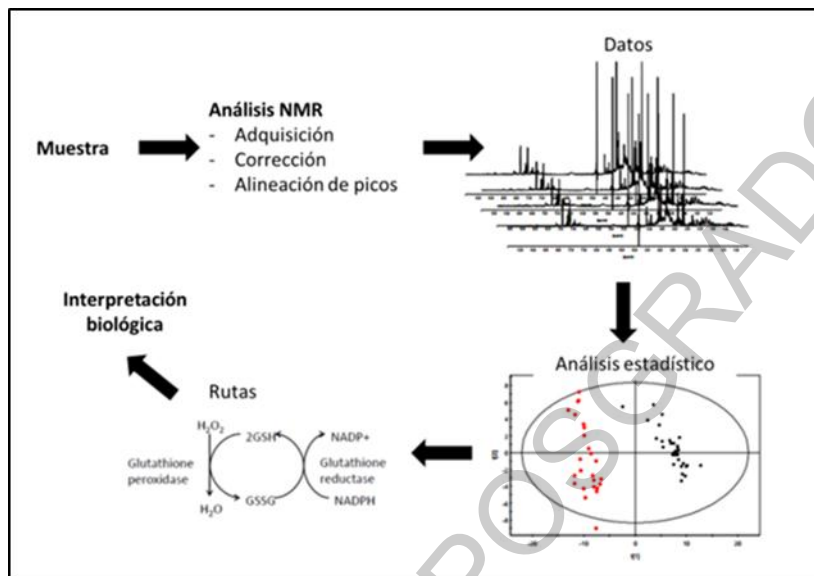


Figura 10. Pasos involucrados en un estudio de metabolómica basada en NMR. Fuente: Brennan (2014)

El análisis de muestras biológicas basado en NMR tiene ventajas significativas para aplicaciones metabolómicas, pues la técnica es inherentemente cuantitativa, no destructiva, y requiere poca o ninguna preparación de la muestra facilitando así los estudios en biofluidos (Reo, 2002). La NMR ofrece oportunidades únicas para la caracterización estructural del metabolito, lo cual es un aspecto esencial para la comprensión de muchos procesos biológicos (Winning *et al.*, 2009). A pesar de estas ventajas considerables, NMR sufre de ciertos inconvenientes pues no es tan sensible como la MS y por ello un análisis por NMR requiere mayor cantidad de muestra. El tema de la sensibilidad se ha abordado con el desarrollo de imanes de mayor campo magnético Bo (11 - 23 Tesla) y con mejoras en el diseño de los detectores

(Griffin, 2004). En un equipo de NMR bien diseñado, la sensibilidad está limitada por el ruido térmico, la mayor parte de lo cual viene de la resistencia de la bobina del receptor y para mejorar esta sensibilidad se necesita el enfriamiento criogénico para lo cual se utiliza las sondas criogénicas. En estos dispositivos un reservorio de helio líquido es cargado en la parte principal de la crio sonda y este reservorio y la línea de transmisión están rodeados por un escudo de radiación enfriado con nitrógeno mientras que la muestra se mantiene a temperatura ambiente (Styles & Soffe, 1984). Sin embargo, el análisis de los metabolitos de baja abundancia por espectroscopia NMR todavía puede resultar problemático.

En la Figura 11, se observa un equipo de NMR de 500 MHz, cuyos componentes se detallan a continuación:

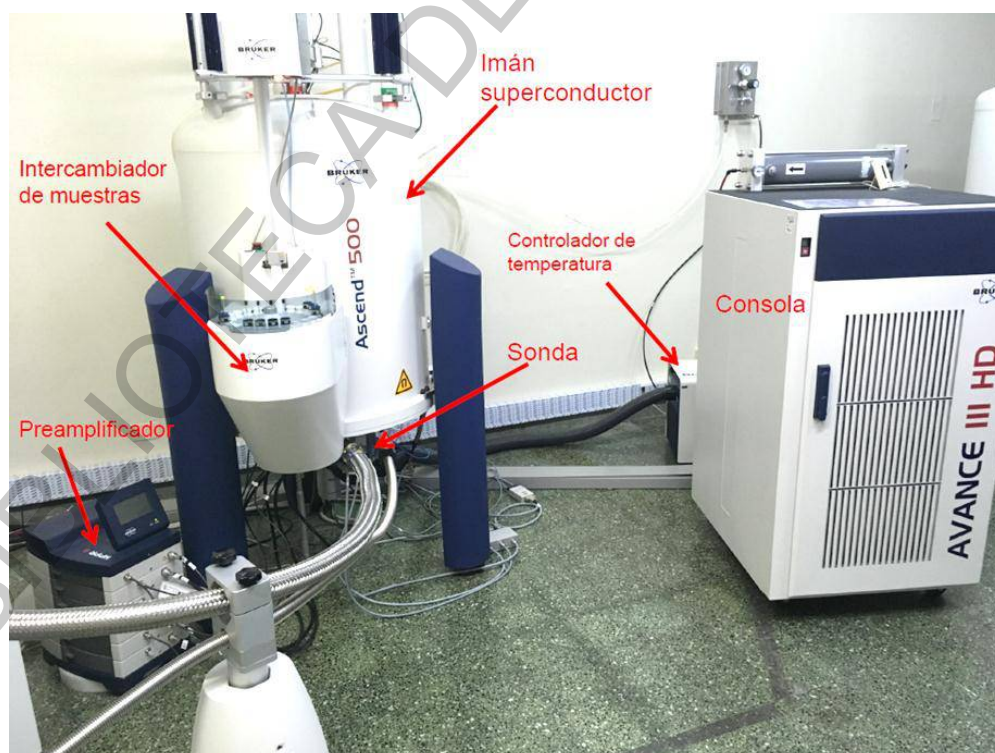


Figura 11. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú (Cortesía del CERMN- PUCP, foto tomada por el Dr. José Carlos Ugaz Peña

- a) **Imán Superconductor:** Es una espira construida en material superconductor que genera un campo magnético constante de 11.75 T, cuando se trata de una espira de 500 MHz. La espira está alojada en un contenedor de helio líquido, aislado por una capa de vacío y seguidamente un contenedor de nitrógeno líquido garantizando la temperatura adecuada para el material superconductor. La muestra es introducida dentro del campo magnético a través del intercambiador.
- b) **Consola:** Dispositivo electrónico responsable de generar y coordinar los pulsos de radio frecuencia que serán aplicados a la muestra. Es la unidad de gerenciamiento de todo el sistema.
- c) **Sonda:** Dispositivo donde se aplican los pulsos de radio frecuencia a la muestra mediante bobinas adecuadamente sintonizadas para tal propósito. Estas mismas bobinas son responsables de la adquisición de la señal.
- d) **Preamplificador:** Dispositivo electrónico donde la señal adquirida recibe un tratamiento preliminar a fin de reducir interferencias.
- e) **Controlador de temperatura:** Dispositivo de refrigeración que suministra un flujo regular de aire (previamente tratado) para regular la temperatura de la muestra en análisis.
- f) **Intercambiador de muestras:** Dispositivo electro-neumático que permite introducir y retirar muestras al espectrómetro.

I.3.2 Espectrometría de masas (MS)

El proceso de análisis por MS está basado en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por las diferentes técnicas de ionización, al

atravesar campos eléctricos y magnéticos. Los iones son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente. Un espectrómetro de masas consta de varios componentes básicos: (1) dispositivo de introducción de la muestra, (2) cámara de ionización o fuente, donde se generan los iones a partir de las sustancias químicas a analizar (3) analizador, que diferencia los iones generados en función de su relación m/z (4) detector que produce una señal eléctrica amplificada para cada uno de los iones que inciden sobre éste (Romero *et al.*, 2007) (Figura 12).

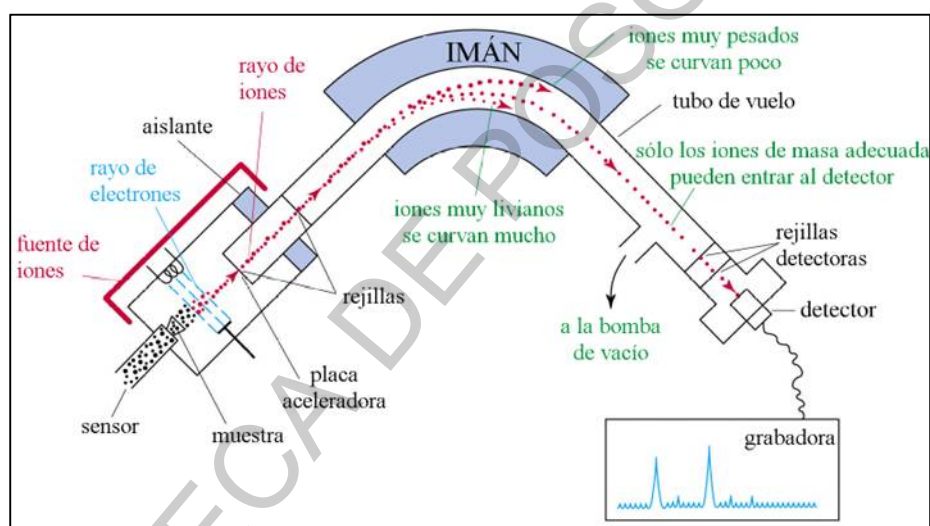


Figura 12. Esquema del sector magnético de un Espectrómetro de Masas. Fuente: Romero *et al.*, (2007)

La alta sensibilidad de la MS combinada con su amplio rango dinámico es una herramienta muy poderosa para el análisis de grandes poblaciones de metabolitos, permitiendo además su cuantificación con capacidad de analizar biofluidos con extrema complejidad molecular (Lee do *et al.*, 2010). La MS dentro de metabolómica puede perfilar el impacto del tiempo, del estrés, estado nutricional y perturbación medioambiental en

cientos de metabolitos simultáneamente, dando como resultado un conjunto de datos globales o específicos (Zhang *et al.*, 2012).

Sin embargo, la MS también tiene algunas debilidades entre ellas, 1) requiere mayor tiempo en la preparación de la muestra (los metabolitos de bajo peso molecular de las muestras biológicas normalmente tienen que ser extraídos con solventes orgánicos diversos: y, 2) la eficiencia de ionización depende de las características fisicoquímicas de cada metabolito y del modo de ionización elegido. Debido a esto último, la cuantificación precisa de un metabolito requiere del uso de estándares internos de isótopos estables (Weckwerth & Fiehn, 2002).

La MS se puede utilizar para analizar muestras biológicas mediante inyección directa o tras separación cromatográfica. Recientes mejoras en los equipos de MS han ampliado considerablemente la gama de metabolitos que pueden ser analizados e identificados. La inyección directa al MS, por ejemplo, permite el análisis de un gran número de metabolitos y por lo tanto se utiliza extensivamente para huellas dactilares metabólicas (*fingerprinting*). Sin embargo, esta modalidad tiene algunas desventajas, incluyendo co-supresión y baja eficiencia de ionización (Zhang *et al.*, 2012). Estos problemas generalmente son aliviados al hacer pasar la muestra primero por un sistema de cromatografía, ya sea líquida (HPLC o UPLC) o de gases (GC). La etapa cromatográfica es capaz de reducir el número de analitos que compiten y que ingresan en el MS, mejorando así su detección (Pham-Tuan *et al.*, 2003). Como resultado, la cromatografía líquida acoplada a MS es una técnica potente muy utilizada

en la obtención del perfil de metabolitos de bajo peso molecular en fluidos (Plumb *et al.*, 2002 ; Plumb *et al.*, 2003; Idborg-Bjorkman *et al.*, 2003; Aharoni *et al.*, 2002).

Cromatografía Líquida de Ultra Performance - Espectrometría de Masas: *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - Mass Spectrometry (MS)*. Este tipo de cromatografía líquida se distingue de la común de alta performance (HPLC), se detalla en Figura 13, pues hace uso de una fase estacionaria consistente con partículas porosas menores de 2 μm , mientras que las columnas HPLC por lo general trabajan con partículas de 3 a 5 μm (Kumar *et al.*, 2012), detalle que exige presión de solvente mayores e involucra tiempo de elución menores. La tecnología UPLC ofrece como resultado una mejor resolución de señales, mayor especificidad y capacidades de alto rendimiento (Figura 14). UPLC también permite un análisis más rápido sin pérdida de resolución. Las desventajas del UPLC se encuentran asociadas al aumento de la presión, lo que exige un mantenimiento continuo de otra manera se reduce la vida de las columnas de este tipo (Kumar *et al.*, 2012).

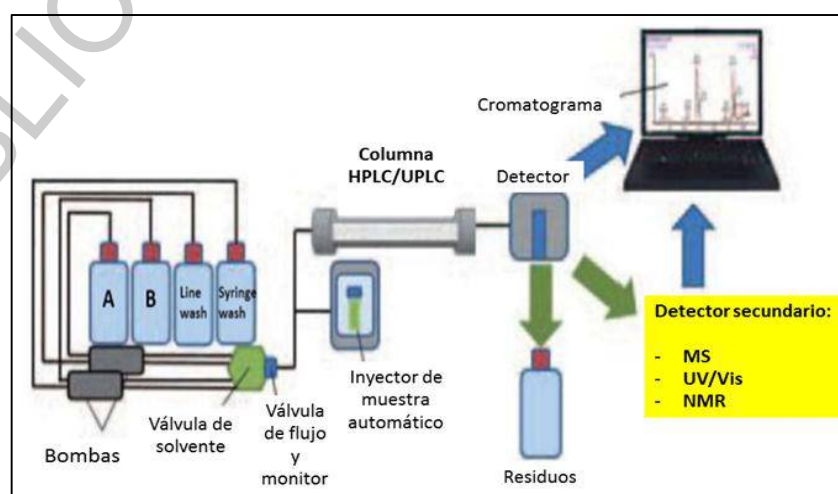


Figura 13. Sistema alternativo HPLC/UPLC acoplado a MS / UV-Vis / NMR. Fuente: Kumar *et al.*, (2012).

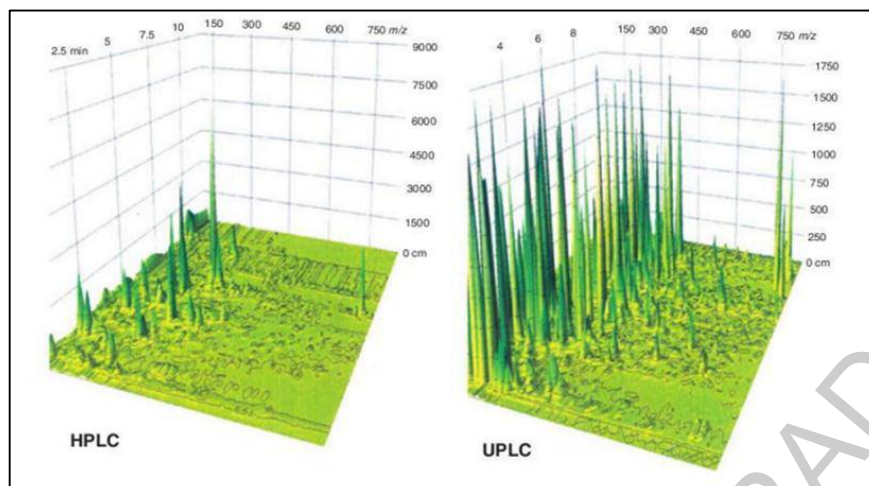


Figura 14. Diferencias entre HPLC y UPLC. Fuente: Kumar *et al.*, (2012)

La combinación de UPLC con detección MS permite identificar un mayor número de metabolitos polares y, por lo tanto, aumenta la capacidad en el número de analitos detectados, en comparación con HPLC- DAD. En vista de los recientes desarrollos en las ciencias de la separación, el advenimiento de esta tecnología ha demostrado mejorar la resolución de diferentes tipos de metabolitos y la precisión de las mediciones de sus masas. El analizador de masas puede ser la combinación de un Cuadrupolo (Q) con un analizador de Tiempo de Vuelo (*Quadrupole-Time of Flight-Mass spectrometry-Q-TOF-MS*). El nivel de precisión de medida de masa en equipos como estos es menor a los 5 ppm. Dado el poder de esta tecnología, metodología UPLC-Q-TOF representa una prometedora plataforma para el desarrollo de estudios metabólicos.

I.3.3 Estudios químico- analíticos en la *Solanum tuberosum* L.

Existen muchos estudios con papa, realizados mediante HPLC acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD) (Mattila & Hellstrom, 2007 ; Burgos *et al.*, 2013; Blessington *et al.*, 2010; Elzbieta, 2012). En la Tabla 3, se presentan estudios realizados con HPLC-DAD-MS/MS y UHPLC-DAD-MS/MS. La mayor ventaja de utilizar como detector al espectrómetro de masas, es que este permite confirmar la estructura del analito no sólo a través de su masa (m/z) sino de sus fragmentos (MS/MS) (De Jager *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2016).

En las últimas investigaciones Friedman *et al.*, (2017) reportan el contenido de glicoalcaloides (α -chaconina y α - solanina), compuestos fenólicos y flavonoides totales extraídos de tres (3) tipos de cáscaras de papa Russet, cultivo con abono químico y cultivo orgánico. Los glicoalcaloides y los compuestos fenólicos fueron determinados usando HPLC y LC-MS y el contenido total de fenólicos y flavonoides por colorimetría. Los resultados mostraron una gran variación en el contenido de glicoalcaloides y compuestos fenólicos, flavonoides y actividad oxidativa en las muestras estudiadas.

Giusti *et al.*, (2014) estudiaron los compuestos fenólicos de variedades nativas andinas de diferentes especies de color de la *Solanum*. Las antocianinas que encontraron en mayor concentración fue la petunidin- 3 cumaroil-rutinosido-5-glucósido y la pelargonidin-3-cumaroil-rutinosido-5-glucósido, en extracto de papa purpura y rojo respectivamente.

Mediante el trabajo de López-Cobo *et al.*, (2014) se identifican los principales polifenoles en la pulpa, cáscara y el tubérculo entero de dos (2) cultivares (Blue

Bell y Melody) por HPLC-DAD-Q-TOF-MS. El cultivar Blue Bell, las cáscaras tuvieron la mayor cantidad de polifenoles.

Digno de mención es también el estudio de Narváez Cuenca *et al.* (2012), en el cual se reporta en papas comerciales Victoria (con cáscara), el contenido de ácido clorogénico de 25.43 ± 0.49 mg/100 g ms, lo que representa el 55.6 % (p/p) del total de compuestos fenólicos, mientras que el neoclorogénico representa el 5.3%, criptoclorogénico el 6.0 % y el ácido cafeico el 2.5 %.

BIBLIOTECA DE POSGRADO

Tabla 3. Técnicas metabolómicas utilizadas para la cuantificación de compuestos bioactivos en *Solanum tuberosum* L.

Muestras de papa	País	Técnica de Análisis	Compuestos Bioactivos	Autor, año
Compradas en USA	Corea	HPLC-DAD/ MS	Ácidos fenólicos	Im <i>et al.</i> , (2008)
Vitelotte Noire	Italia	HPLC-DAD/ MS	Ácidos fenólicos Glicoalcaloides Antocianinas	Mulinacci <i>et al.</i> , (2008)
Diversos cultivares y nativas chilenas	Inglaterra	GC-MS	Metabolitos polares y apolares	Dobson <i>et al.</i> , (2010)
Austria, Alemania Italia, Francia	Italia	HPLC-DAD/ MS	Ácidos fenólicos, Glicoalcaloides Antocianinas	Ieri <i>et al.</i> , (2011)
17 cultivares de papa cosechadas en Luxemburgo	Luxemburgo	UPLC-DAD-MS/MS	Compuestos fenólicos	Deuber <i>et al.</i> , (2012)
Comerciales Victoria	Holanda	UPLC-DAD-ESI-MS	Ácidos fenólicos	Narváez-Cuenca <i>et al.</i> , (2012)
Comerciales colombianas	Holanda	UPLC- MS	Ácidos fenólicos	Narváez-Cuenca <i>et al.</i> , (2013)
20 Papas andinas diferentes - CIP	USA	HPLC-DAD/MS	Antocianinas	Giusti <i>et al.</i> 2014
Blue Bell Melody	España	HPLC- DAD/ Q-TOF	Compuestos fenólicos	López -Cobo <i>et al.</i> , (2014)
Cáscara papas Russet	USA	LC-MS/CG-MS LC/MS	Compuestos fenólicos Glicoalcaloides	Friedman 2017

Utilizando la técnica de NMR (Tabla 4), y teniendo en cuenta las últimas investigaciones, queda claro que los estudios se están enfocando cada vez más a cubrir aspectos de naturaleza agronómica, como, por ejemplo, el perfil metabolómico no-dirigido a las hojas de la planta de papa asociado a la resistencia del “tizón tardío” bajo condiciones de cultivo. Fue observado altos niveles de ácido málico, metanol y rutina, así como un bajo contenido de sucrosa en comparación a lo detectado en los cultivos susceptibles a esta plaga (Tomita *et al.*, 2017).

Mediante la técnica “in situ” qNMR (NMR cuantitativo) se ha podido obtener el contenido de sacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos en papa cruda y cocida en tiras. Esta técnica ha demostrado que se puede aplicar a matrices gelatinosas (Aisala *et al.*, 2016).

Dado que los alcaloides esteroidales son compuestos químicos presentes en abundancia en la familia de las *Solanum* y que dichos compuestos gozan de actividades farmacológicas diversas, como actividad citotóxica, antiviral, antiinflamatoria y anti fúngica, la búsqueda de estos fitoquímicos en la *Solanum tuberosum* es el objeto de estudio de muchos investigadores. En el trabajo de Zhang *et al.*, (2013), de la parte área de la *S. tuberosum* se aislaron seis (6) glicósido esteroideales, con diferentes R¹, R², R³ Entre ellos, uno (1) raro, el 14 α -hidroxi glicósido esteroideales, dos (2) nuevos 7-oxo derivados y el otro, el muy conocido el alcaloide esteroideales, α -solanina. Se realizó también la evaluación citotóxica contra líneas de células de cáncer humano.

Asimismo, mediante espectroscopía de 1D y 2D NMR, y mediante la comparación de los espectros con los ya estudiados un tipo de espectroscopía (HRMAS-NMR) (*High Resolution Magic Angle Spinning-NMR*) fue exitosamente utilizada para determinar los perfiles metabólicos de 78 tubérculos de 3 genotipos cultivados bajo manejo orgánico y convencional. Se evaluó la variación en el contenido de hidrógeno, nitrógeno y carbono. El análisis estadístico multivariado discriminó entre las variedades y los sistemas de cultivo, sugiriendo que este método es una herramienta potente para caracterizar papas orgánicas (Pacífico *et al.*, 2013).

Tabla 4. Estudios de RMN en *Solanum tuberosum* L

Investigaciones	Técnicas analíticas utilizadas	País	Referencia
Perfiles con modificaciones genéticas de <i>Solanum tuberosum</i> cv Record, cv. Desiree	NMR y HPLC-UV	Italia	Defernez <i>et al.</i> ,(2004)
Espectros completos de ^1H y ^{13}C NMR de glicoalcaloides dehydrocommersonine.	^1H ^{13}C NMR	Canadá	King & Calhoun, (2012)
Metabolómica para la trazabilidad de cultivos orgánicos y convencionales de papa	NMR	Italia	Pacífico <i>et al.</i> , (2013)
Identificación de cinco nuevos glicoalcaloides de <i>Solanum tuberosum</i>	1D- 2D- NMR y HR-ESI-MS	China	Zhang <i>et al.</i> , (2013)
Diferenciación de metabolitos entre papa cruda y tiras de papa cocida al vapor	^1H NMR	Finlandia	Aisala <i>et al.</i> ,(2016)
Estudio de los cambios metabólicos en las hojas de papa basado en el perfil metabólico en relación con la resistencia a la enfermedad de “tizón tardío” en condiciones de campo.	NMR	Japón	Tomita <i>et al.</i> ,(2017)

Dada la importancia de estas dos técnicas, UPLC-MS y NMR, en el área de la metabolómica, ambas fueron empleadas en el estudio de papa aquí planteado. A través de la primera se abordó el perfil de 15 compuestos fenólicos en papa y mediante NMR de ^{31}P se evaluó el contenido de fitatos en papa.

BIBLIOTECA DE POSGRADO

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Objeto de Estudio

En el estudio LC-MS el material de estudio fue papa nativa, variedad Huagalina, cultivada en las localidades de El Zuro (EZ), zona ubicada a 3 750 m.s.n.m y de Huayatán Alto (HA) a 3 150 m.s.n.m en el distrito y provincia de Santiago de Chuco ($8^{\circ}08'44''S$ $78^{\circ}10'31''O$), Región La Libertad (Perú). El material fue cosechado en mayo 2015. Las características agronómicas del cultivo fueron las siguientes: en EZ, suelo franco arenoso, de buen drenaje, pendiente moderada y profunda, pH 5.3 (ácido), conductividad eléctrica: 0.3 dS/m (no salino), materia orgánica: 6.4% (muy alto), fósforo: 17 ppm (alto) y potasio 477 ppm (muy alto), temperatura promedio anual de $9^{\circ}C$ (clima frío seco), abonamiento orgánico (Guano de las Islas 2 ton/ ha) y cultivo al secano; y, en HA, suelo franco y de buen drenaje, con pendiente ligeramente pronunciada y medianamente profunda, pH 5.0 (ácido), conductividad eléctrica: 1.5 dS/m (no salino), materia orgánica: 5.2% (alto), fósforo: 14 ppm (medio) y potasio: 80 ppm (bajo), temperatura promedio anual de $10^{\circ}C$ (clima templado con presencia de lloviznas), abonamiento inorgánico (180-200-160 kg de NPK/ha y cultivo al secano.

En el estudio de NMR, el material bajo estudio fue la papa nativa Huagalina cultivada en la provincia de Julcán, cosechada en Mayo 2017 en el caserío La Victoria (3439 m.s.n.m, $8^{\circ}03'08.10''S$ y $78^{\circ}31'11.99''O$) - Región La Libertad y se comparó con papa comercial Canchan adquirida en supermercado en la ciudad de Lima.

II.2 Instrumentación

Sistema de Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (UPLC-MS/MS) disponible en el Núcleo de Análisis de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV Viçosa (Brasil) conformado por un equipo Agilent 1200 Infinity Series acoplado a un Espectrómetro de Masas triple cuadrupolo (QqQ) modelo 6430 Agilent Technologies. Columna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 μm , 2.1 x 50mm) (Agilent) en serie con una guarda columna Zorbax SB-C18, 1.8 μm (Agilent). Agitador vortex. Sonicador. Centrífuga marca Boeco modelo S-8. Se utilizó un Liofilizador LABCONCO Freeze DrySystem/Free Zone 4.5 (Kansas City, Mo. US) para las rodajas de papa cruda. Para el proceso de extracción del ácido fítico de la papa se utilizó un Vortex IKA M5 3 basic; Sonicador SYMPHONY™ VWR; Centrífuga ThermoScientific Sorvall Biofuge Stratos (Langensfeld, HE, DE) y para pulverizar la muestra un molino eléctrico marca Bosch MKM6003.

Los experimentos de NMR para determinar ^{31}P se realizaron en un equipo marca BrukerAscend™ 500 y la consola AVANCE III HD, con una sonda de banda ancha sintonizada para detectar resonancia de ^{31}P a 202 MHz (Bruker, Biospin GmbH), equipo disponible en la Pontificia Universidad Católica del Perú. Dicho instrumento cuenta con un sistema de control de temperaturas BCU I-40/50 (Bruker Biospin GmbH). Los espectros fueron procesados en el software BrukerTopSpin 3.5.b.91p17 (BrukerBioSpinGmbH) en los que se muestran los desplazamientos químicos (δ) en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

II.3 Métodos y Técnicas

II.3.1 Materiales y Reactivos

Estándares de referencia de grado HPLC, fueron adquiridos en Sigma- Aldrich (USA): Ácido 3,5 dihidroxi benzoico, ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido 4-hidroxi benzoico, ácido cafeico, ácido siríngico, vainillina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldehído, cumarina, daidezeína, genisteína, 7-hidroxi-flavona ; metanol grado HPLC > 99.9 %, ácido fítico (sal de sodio hidratada de arroz), Fosfato de sodio dibásico > 99.9 % . Se adquirió de Fluka Analytical: Acetonitrilo (ACN) grado LC-MS, ácido acético grado HPLC. Se adquirió de Merck KGaA-Darmstadt-Germany: Hidróxido de sodio, H₃PO₄ 85% (densidad, 1.685 g/ml), Deuterium oxide (D₂O) (deuterium degree min 99%) y de BDH Chemicals Ltd. Poole England) : EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid) y el agua Milli-Q fue obtenida del purificador Millipore modelo integral 3.

II.3.2. Preparación de las muestras para LC-MS

Las muestras de papas cosechadas en EZ y HA fueron lavadas y escurridas, luego cortadas en rodajas de 5 mm de espesor, liofilizadas y envasadas con nitrógeno líquido en frascos de vidrio herméticamente cerrados y trasladadas al Núcleo de Análisis de Biomoléculas (NuBioMol) de la Universidad Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil). Las rodajas liofilizadas de papa fueron peladas, separándose cuidadosamente la cáscara de la pulpa con bisturí, y fueron trituradas separadamente en mortero hasta obtener un polvo fino. Se preparó la siguiente solución de extracción (SE): 50 % metanol, 50 % de agua desionizada y 0.5% de ácido acético. Los compuestos fenólicos fueron extraídos de la cáscara y de la

pulpa en forma separada, y se utilizó la SE descrita por (Narvaéz-Cuenca *et al.*, 2012). Separadamente se tomó 0.02 g de polvo de cáscara y 0.02 g de pulpa para extraer los metabolitos con 500 μ L de SE. Las muestras fueron mezcladas en agitador vortex (4 veces por 10 segundos), sonicadas (10 minutos a 4°C) y mantenidas en hielo (30 minutos). Después de centrifugar (15000 g por 10 minutos a 4°C), se tomó 350 μ L del sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo. Este proceso fue repetido por 2 veces adicionales, obteniéndose el extracto de la cáscaras y pulpas de las muestras. Una última centrifugación (20000 g por 10 minutos a 4°C) fue realizada para remover cualquier resto de tejido en suspensión, luego se almacenó a -80 °C hasta posterior análisis.

II.3.3 Preparación de las muestras para el estudio de RMN-³¹P

Las papas se lavaron con agua corriente y se dejaron orear hasta el otro día en oscuridad. Se registró su peso, forma y color. Se cortaron en rodajas de 5mm de espesor y luego liofilizadas. A las rodajas liofilizadas se les separó la cáscara de la pulpa con un bisturí y el material separadamente se pulverizó en el molidor eléctrico, hasta obtener un polvo fino. Las muestras fueron guardadas a -75 °C hasta posterior análisis.

La extracción de los fosfatos se realizó pesando 1.00 g de cáscara o pulpa de papa con 6.25 mL de NaOH 1M, 6.25 mL de agua Milli Q y 12.5 mL de EDTA 0.1 M. Se agitó la suspensión por 4 horas con agitador magnético a temperatura ambiente. Luego de ello se centrifugó a 23000 g por 20 minutos a 10 °C. Los sobrenadantes se liofilizaron hasta peso constante. Las muestras fueron guardadas hasta el análisis de NMR- ³¹P. Se hicieron modificaciones a la metodología de Oghogho *et al.*, (2016).

II.3.4 Determinación de compuestos fenólicos en *S. tuberosum* L. mediante UPLC-MS/MS.

La muestra fue automáticamente inyectada (5 μ L) en el sistema UPLC - MS/MS. La separación cromatográfica fue realizada en una columna en serie con una guarda columna. La gradiente de elución fue realizada con un sistema binario de solventes consistiendo de ácido acético 0.02 % en agua (A) y ácido acético 0.02 % en acetonitrilo (B) en un flujo constante de 0.3 mL/minuto en la columna a temperatura de 30°C. Se utilizó una gradiente lineal con las siguientes proporciones de solvente B: gradiente de 0 a 11 minutos y de 5 a 60 % de B; 11 a 13 min y de 60 a 95% de B; 13 a 17 minutos y 95 % de B; 17 a 19 min y de 95 a 5 % de B; 19 a 20 minutos y 5 % de B.

La ionización producida en el espectrómetro de masas fue ESI (*Electrospray Ionization*) siguiendo las siguientes condiciones: temperatura del gas 300 °C, tasa de flujo de nitrógeno 10 L/min, presión del nebulizador 35 psi y voltaje capilar de 4000 V. El equipo fue operado en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). La masa del precursor ion/fragmentado establecido fue monitoreado por pruebas de fragmentación de cada molécula en estudio, siendo los resultados: Acido 3,5-dihidroxi benzoico (155.02/137.01); ácido clorogénico (355.00/163.00); ácido 4-hidroxi benzoico (139.12/121.00); 4-hidroxi-3-metoxi cinamaldehído (179.10/147.04); cumarina (147.06/91.00); daidezeína (255.00/199.00); genisteína (271.00/243.00) ; 7-hydroxiflavona (239.07/137.00); ácido neoclorogénico (353.10/179.00); ácido cafeíco (179.00/135.00); ácido siríngico (197.00/121.200), vainillina (151.00/92.00); ácido *p*-cumárico (163.04/ 119.00); ácido ferúlico

(193.00/134.00) y ácido sinápico (223.00/164.10). Los primeros ocho fueron escaneados en el modo positivo mientras que los últimos en modo negativo.

Se preparó la curva de calibración de 1 a 500 ng/mL, utilizando los estándares externos de cada metabolito para determinar la cuantificación absoluta. La data generada fue analizada con el software “Mass Hunter Workstation VB 06.00, obteniendo las áreas de los picos para cada metabolito secundario en ng y luego los resultados expresados en mg/100 g de masa seca.

II.3.4.1 Análisis estadístico

Se utilizó el Análisis de Componentes Principales (PCA *Principal Components Analysis*), utilizando el software XLSTAT 2015 (Licencia digital). Todos los análisis se realizaron con un nivel de confiabilidad del 95%.

II.3.5 Análisis mediante NMR de compuestos de fósforo en *S. tuberosum* L.

Para el ensayo de NMR - ^{31}P se pesó 100 mg del extracto liofilizado, se le agregó 700 μL de D_2O , 100 μL de solución (1.5M NaOH+0.3 M EDTA) y 100 μL de NaOH 10 M. Se procedió a sonicar por 30 minutos a temperatura ambiente y de esta solución se transfirió 600 μL a tubo NMR, se insertó estándar externo de H_3PO_4 (0.76-0.98mM) y se realizó la lectura por NMR ^{31}P . La concentración del estándar externo de H_3PO_4 se calculó a partir de la concentración del estándar interno Na_2HPO_4 a 14.06 mM: 10 mg en 500 μL de solución (1.5M NaOH+0.3 M EDTA) y 500 μL de NaOH 10 M enrasado a 5 mL con D_2O . El estándar de ácido fítico se preparó de manera análoga.

El estándar externo de H_3PO_4 se preparó a partir de H_3PO_4 (85%): 250 μL de H_3PO_4 / 5 mL de agua MilliQ, haciendo una dilución de 1/100 y los 5 capilares preparados, una vez sonicados, fueron sellados al calor.

Los espectros de NMR - ^{31}P fueron adquiridos por una secuencia de pulsos Zgig30, con 32,768 puntos digitales (TD); 8,192 escaneos (NS) y 64 escaneos señuelos(DS); con resolución de FID de 0.98 Hz (FIDRES), tiempo de adquisición de 1.0 segundo (AQ); ganancia de receptor (RG) de 202.6; tiempo de retraso D1 de 4.0 segundos; D11 de 0.030 seg y ensanchamiento de banda (LB) de 1.0 Hz. Los espectros fueron tomados por el Dr. Juan López Smith.

La concentración de los compuestos fosforilados se obtuvo aplicando la siguiente formula:

$$\text{Conc. comp. fosforilados} = \frac{\text{Area comp. fosf} * \text{Conc. H3 P04}}{\text{Area H3 P04}}$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Estudio UPLC-MS/MS de *Solanum tuberosum* L.

Las curvas de calibración UPLC-MS/MS de los 15 metabolitos de interés en este estudio se muestran en la Tabla 5, cuya linealidad es óptima al rango de concentración abordado, 1– 500 ng/mL. A pesar de que las curvas de calibración no han sido validadas en cuanto a precisión y reproducibilidad, según las normas de la International Conference on Harmonization (ICH, 1996), éstas fueron empleadas para la cuantificación de estos 15 metabolitos en papa (Anexo I). Las concentraciones registradas para estos compuestos en las cuatro muestras de papa analizadas se muestran en la Figura 15. Los resultados indican que los compuestos fenólicos se encuentran en mayor concentración en la cáscara del tubérculo. Son cuatro los fenólicos que resaltan (expresados en mg/100 g ms \pm error): Ácido clorogénico (510.55 ± 25.04 y 376.81 ± 3.11), ácido neoclorogénico (32.48 ± 2.067), ácido cafeico (81.69 ± 2.89 y 69.24 ± 1.90) y vainillina (12.18 ± 0.74 y 8.92 ± 0.07). Los valores de ácido clorogénico, ácido cafeico y vainillina fueron mayores en 26.19%; 20.00% y 26.97 % respectivamente, en la cáscara de papa cultivada en EZ que en HA mientras que el ácido neoclorogénico fue menor en EZ por 33%. Asimismo, genisteína ni 7- hidroxiflavona, han sido detectados en papa, cáscara o pulpa; y, de los 15 metabolito abordados, 9 se hallan en concentraciones menor a 1 mg/100 g ms (ácido 3,5 dihidroxi benzoico; cumarina; ácido sirínico; ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, 4- hidroxiflavona, 3-metoxi cinamaldehído, diadzeína y 4 hidroxibenzoico). Este resultado es importante pues todos estos compuestos resaltan por sus propiedades antioxidantes (Lewis *et al*, 1999; Ezequiel *et al*. 2013).

Tabla 5. Curvas de calibración UPLC-MS-MS de metabolitos de interés.

Metabolito	Ion molecular/fragmento (modo)	Ecuación (R ²)
Ácido 3,5 dihidroxi benzoico	155.02/137.01 (+)	$y = 8.1299x$ (R ² = 0.9961)
Ácido neoclorogénico	353.10/179.00 (-)	$y = 75.4x + 34.752$ (R ² = 1.0000)
Ácido clorogénico	355.00/163.00(+)	$y = 257.85x + 1735.1$ (R ² = 0.9986)
Ácido 4- hidroxibenzoico	139.12/121.00(+)	$y = 20.681x$ (R ² = 0.9880)
Ácido cafeico	179.00/135.00(-)	$y = 113.43x + 1386.5$ (R ² = 0.9979)
Ácido siríngico	197.00/121.20(-)	$y = 14.781x + 197.37$ (R ² = 0.9939)
Vainillina	151.00/92.00 (-)	$y = 27.647x + 186.99$ (R ² = 0.9994)
Ácido <i>p</i>- cumárico	163.04/119.00 (-)	$y = 234.42x + 1808.3$ (R ² = 0.9984)
Ácido ferúlico	193.00/134.00 (-)	$y = 33.738x + 331.14$ (R ² = 0.9979)
Ácido sinápico	223.00/164.10 (-)	$y = 35.59x + 282.7$ (R ² = 0.9980)
4-hidroxi -3- metoxi cinamaldehído	179.00/147.04(+)	$y = 566.85x + 12235$ (R ² = 0.9887)
Cumarina	147.06/91.00(+)	$y = 426.03x + 2522$ (R ² = 0.9992)
Daidezeína	255.00/199.00(+)	$y = 146.55x + 2875.2$ (R ² = 0.9905)
Genisteína	271.00/243.00(+)	$y = 30.077x + 263.61$ (R ² = 0.9974)
7-hidroxi flavona	239.07/137.00(+)	$y = 95.547x + 546.82$ (R ² = 0.9990)

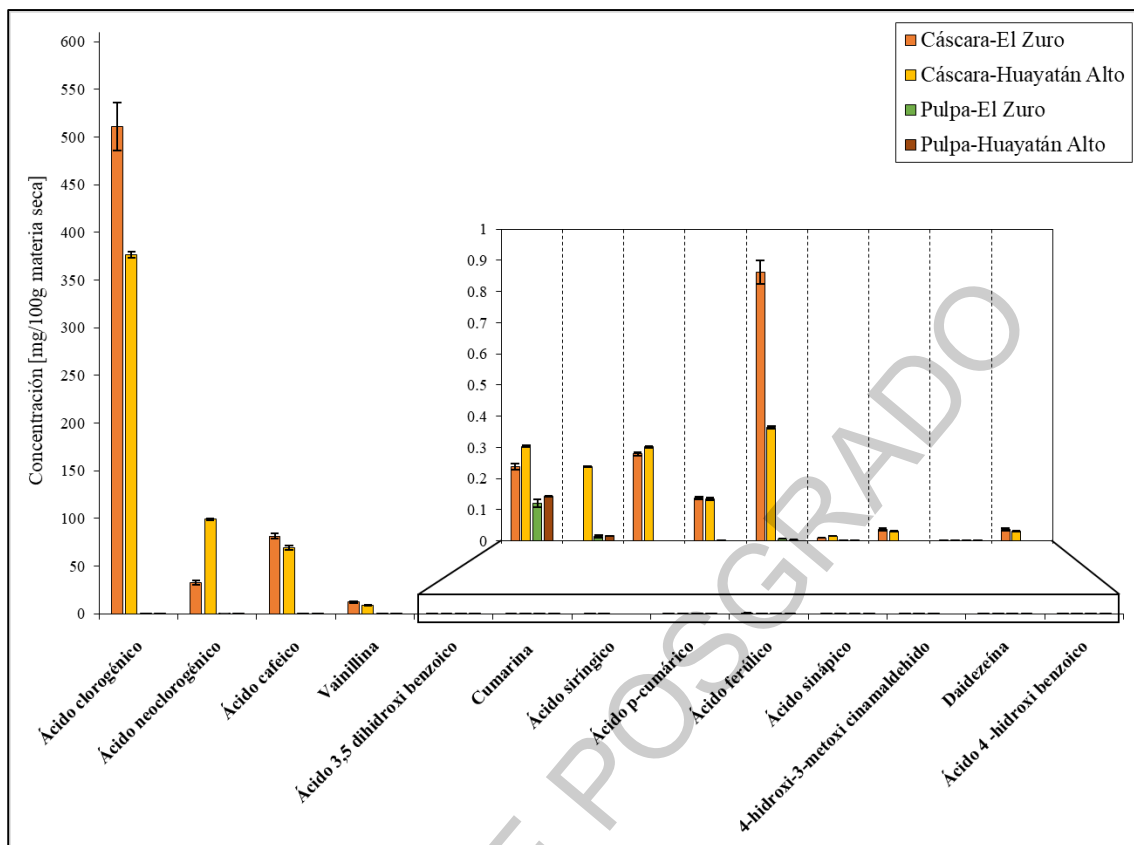


Figura 15. Compuestos fenólicos en papa nativa Huagalina

Los valores encontrados en esta investigación de papa nativa Huagalina (pulpa amarilla) para ácido clorogénico y sus isómeros están en el rango (mg/100g ms): 543.03 (EZ) y 475.91 (HA) y para el ácido cafeico 81.62 (EZ) y 69.24 (HA) en la Región La Libertad. Estas concentraciones son mayores en orden de magnitud a las reportadas por André *et al*, (2009) en el estudio de papa nativa SS-2663 CIP 700347 (pulpa amarilla): para el ácido clorogénico y sus isómeros se reportan valores en el rango de 37.6 (HO) y 52.0 (HI) y para el ácido cafeico 2.2 (HO) y 0.7 (HI) en la Región Huancayo.

Navarre *et al.*,(2011) reportaron valores de papa Huagalina silvestre o de germoplasma primitivo que fue cultivada en Sturgeon Bay -Winsconsin (USA),

lugar ubicado a 314 m.s.n.m. y con temperatura media máxima de 26.5 °C, valores de ácido clorogénico y sus isómeros de 70.2 mg/100 g ms y valor de ácido cafeico de 27.7 mg/100 g ms. Estos valores están por debajo de los obtenidos para papa nativa Huagalina cultivada en zona andina de Santiago de Chuco a más de 3 000 m.s.n.m.y con temperatura media máxima de 13 °C, que son factores importantes para la producción de metabolitos secundarios en el tubérculo. Por los altos valores encontrados en papa Huagalina cultivada en la sierra liberteña valores que es recomendable confirmar mediante alguna otra técnica alternativa, como NMR cuantitativo, por ejemplo, pudiendo proponerse como una papa promotora de la salud debido a que el ácido clorogénico, sus isómeros y el ácido cafeico han sido reportados como inhibidores de carcinogénesis (Huang *et al.*, 1998, Sancho & Pastore, 2012, Serafim *et al.*, 2015), reducción de la obesidad (Cho *et al.* 2010), reducción de actividad hipotensiva (Susuki *et al.*, 2002), protección cardiovascular (Monti, 1996; Jiang *et al.*, 2016); protección contra la fibrosis del hígado (Shi *et al.*, 2016; Mikami & Yamazawa, 2015). Con respecto a la vainillina, los estudios *in vitro* han demostrado que tiene efecto inhibitorio a la invasión y migración de células cancerosas observándose la reducción de metástasis de colonias pulmonares en comparación con los controles (Lirdprapamongkol *et al.*, 2005).

El ACP de la Figura 16, mediante el componente F1 muestra que los compuestos fenólicos detectados se encuentran en mayor concentración en la cáscara de la papa que en la pulpa tanto en los cultivos realizados en EZ y HA, concordando con lo reportado por otros autores (Friedman, 1999; Lewis *et al.* 1999, Ji *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016).

Con respecto al componente F2, la cáscara de EZ presentó el 62 % de los metabolitos estudiados, encontrando el ácido sirínico, 4 hidroxibenzoico y el ácido cafeico fuertemente correlacionados y altamente significativos (correlación mayor a 0.90 y $p < 0.05$), lo mismo se presentó para el ácido clorogénico, 4 hidroximetoxi cinamaldehído y vainillina. Esta diferencia de contenido de fenólicos en ambos cultivos podría ser explicada por largos días del cultivo a bajas temperaturas (Reyes *et al.*, 2004), por aplicación de fertilización orgánica y medio ambiente frío (Hajslova *et al.*, 2005), cultivo conducido al secano (Delgado *et al.*, 2001). Existe escasa información sobre la influencia del cultivo con abono orgánico y abono químico sobre el contenido de fitonutrientes, sólo se ha reportado que el cultivo orgánico tiene profundo efecto en el rendimiento (Palmer *et al.*, 2013) y que no hay diferencia significativa en el contenido de proteína en ambos tipos de cultivos (Bartova, 2013). En varias investigaciones (Reddivari *et al.*, 2007; Wegener *et al.*, 2009) resaltan la predominancia de la variación genotípica sobre las condiciones ambientales. Mediante la medición de los niveles de expresión de 13 genes utilizando RT-PCR relacionados con la vía de biosíntesis de polifenoles en cinco genotipos de papa andina demostraron que los perfiles polifenólicos están correlacionados a las variaciones en los perfiles de expresión génica de los cultivares estudiados (André *et al.*, 2009; Hamouz *et al.*, 2010; Lachman *et al.*, 2009).

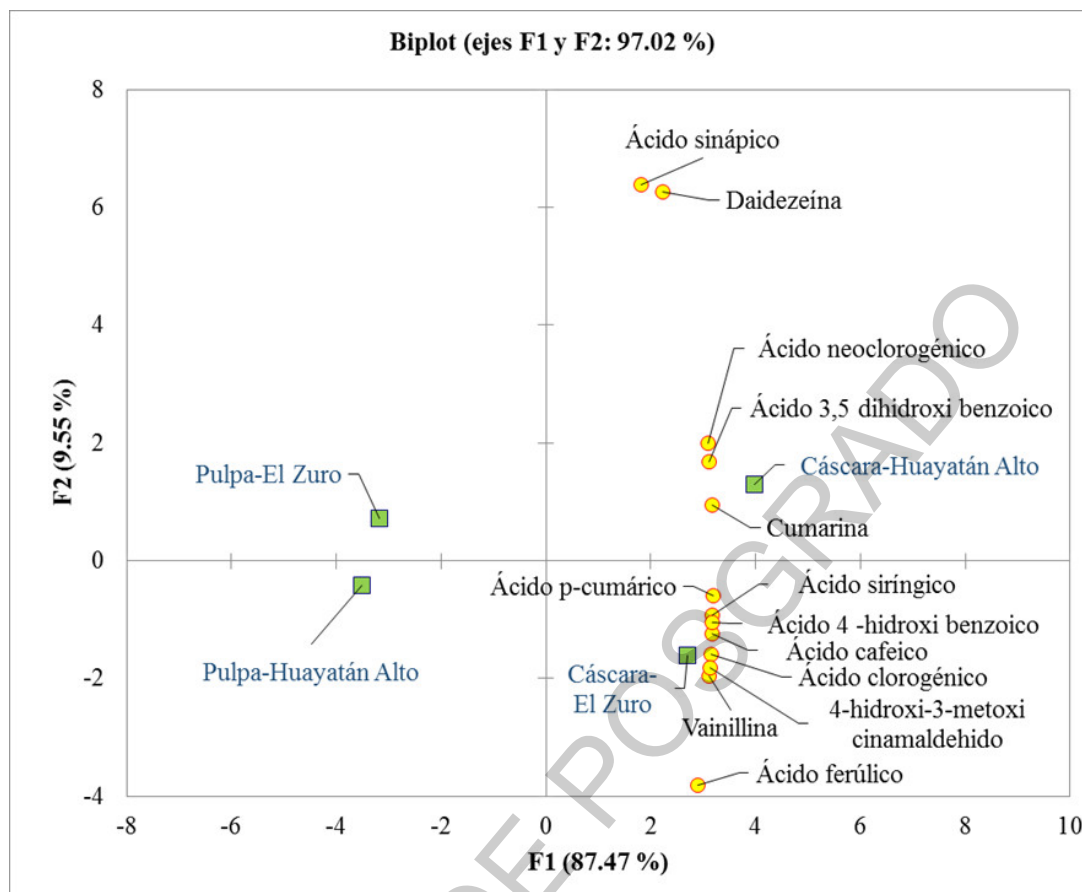


Figura 16. ACP de compuestos fenólicos en cáscara y pulpa de papa Huagalina

Esta información permitiría sugerir, dado el perfil de metabolitos hallados, que la papa nativa Huagalina presenta genes que se expresan en las distintas rutas de biosíntesis de los metabolitos que podrían utilizarse para el reconocimiento varietal o huella digital (*fingerprint*) de esta variedad.

III.2 Estudio NMR ^{31}P de *Solanum tuberosum* L.

La papa en su composición contiene fósforo que, según lo reportado por Santos *et al.*, (2015) está en el rango de 0.130 - 0.261 g/100 g ms. La metodología utilizada en este trabajo, la cual involucra un tratamiento con NaOH - EDTA, permite la identificación de ácido fítico, fosfato libre y el glicerol fosfato. Este último resulta

de la degradación por hidrólisis alcalina (Oghogho *et al.*, 2016). Noack *et al.*, (2012) reportaron valores bajos de glicerol fosfato en extractos de semillas de canola, los cuales fueron atribuidos también a un problema de degradación producto de la extracción realizada con NaOH-EDTA.

En esta investigación, estos tres compuestos fueron detectados mediante NMR de ^{31}P . La metodología de extracción que involucra un tratamiento con NaOH-EDTA, y detección por NMR de ^{31}P ha sido reportado en la literatura como un protocolo de cuantificación de alta eficiencia (88% - 110%) (Oghogho *et al.* 2016). En la Figura 17, se muestra el espectro de ácido fítico (P_2 a 5.022 ppm, P_4P_6 a 4.151 ppm, P_1P_3 a 3.714 ppm, P_5 a 3.598 ppm) en presencia del estándar interno fosfato dibásico de sodio (5.45 ppm) a condiciones altamente básicas (NaOH -EDTA). Se observa en este espectro que la integral guarda relación con el número de átomos debajo de cada señal.

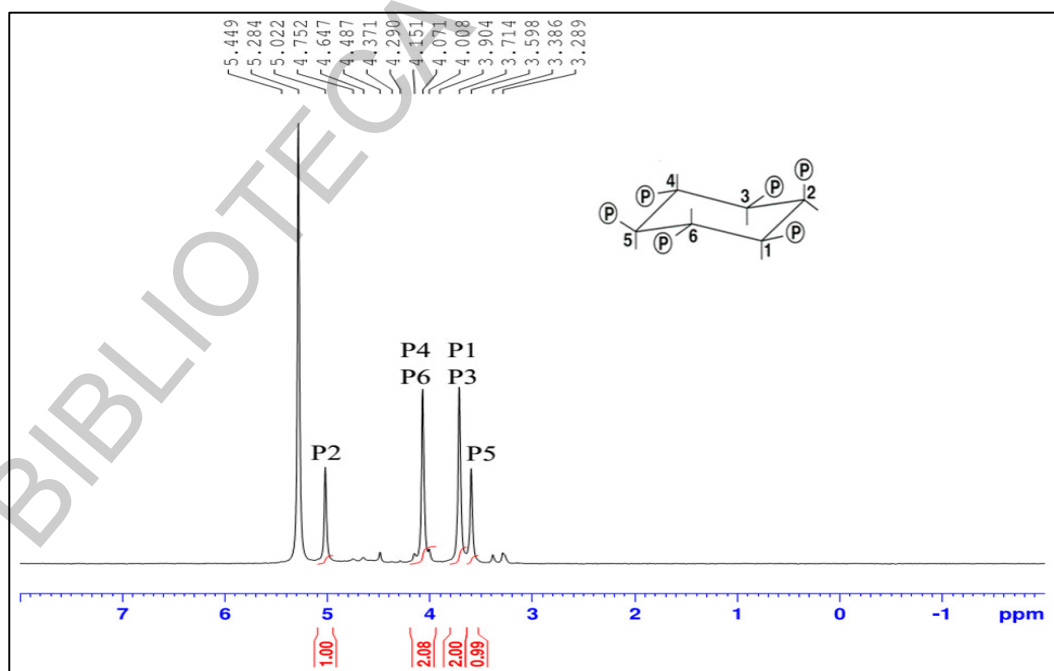


Figura 17. Espectro NMR ^{31}P de ácido fítico

El espectro de NMR ^{31}P del extracto de cáscara y pulpa de papa Huagalina y los correspondientes espectros de la papa Canchan se muestra en las Figuras 18 y 19 y Anexo II. Es importante recalcar que en estos espectros además de las señales del ^{31}P del ácido fítico se observan otras, entre ellas la del fosfato a 5.50 ppm y la del glicerol fosfato a 4.42 ppm. Dado que estos desplazamientos químicos coinciden con lo reportado en la literatura para estos tres tipos de fósforo (Oghogho *et al.*, 2016), se emplean las áreas debajo de estas señales para cuantificar su presencia en los distintos extractos de papa abordados. La cuantificación de estos compuestos se refirió a la concentración de un estándar externo, ácido fosfórico en capilar a $\delta = 0.0$ ppm. La concentración de la solución de ácido fosfórico en cada capilar utilizado en ese estudio fue calculada a través de un estándar interno (sodio fosfato dibásico) a una concentración de 78 mM. La concentración hallada del estándar externo, ácido fosfórico en capilar, fue de 0.89 ± 0.06 mM.

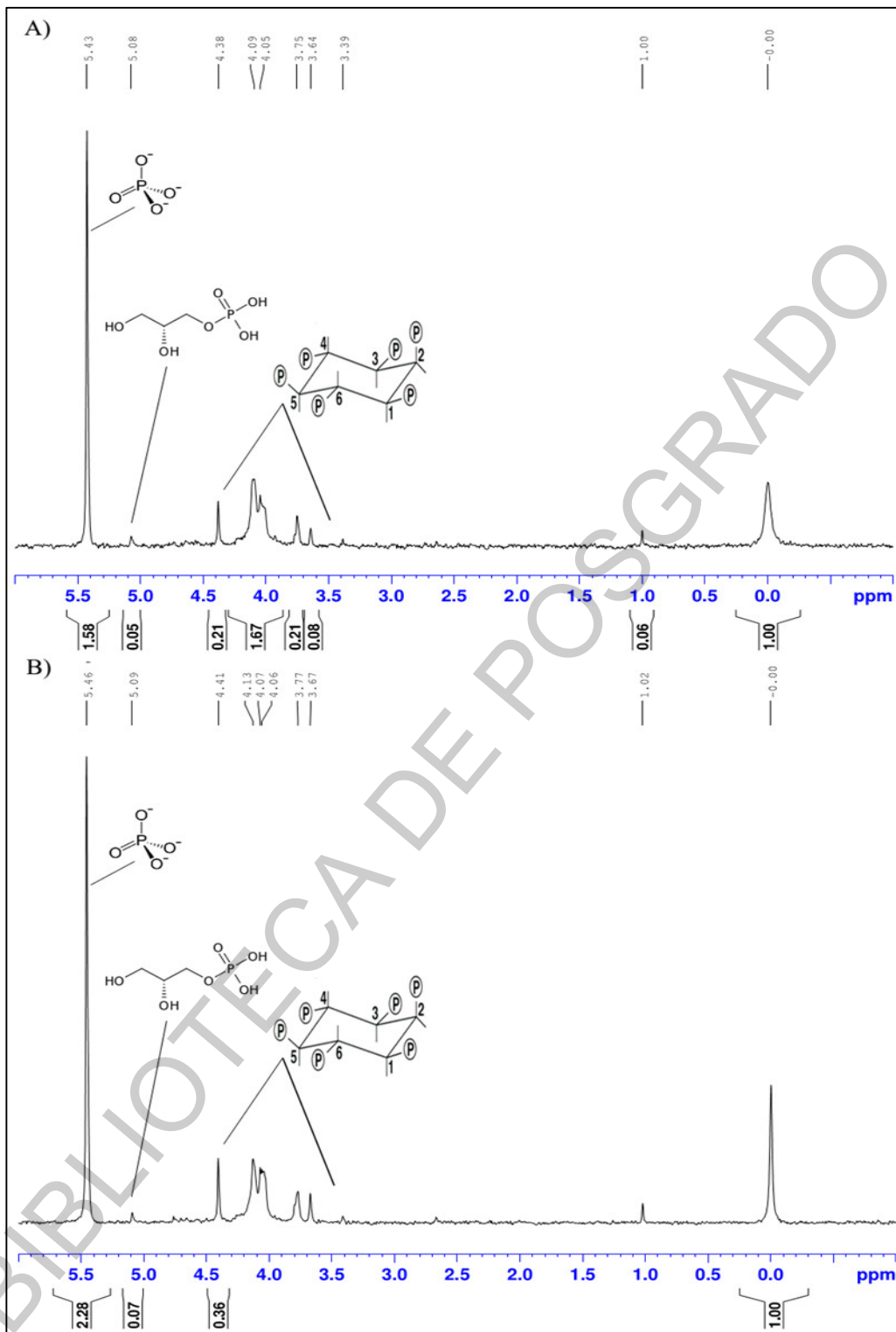


Figura 18. Espectro de NMR³¹P (Fosfato, glicerol fosfato y fitato) de A) Pulpa y

B) Cáscara de papa Huagalina

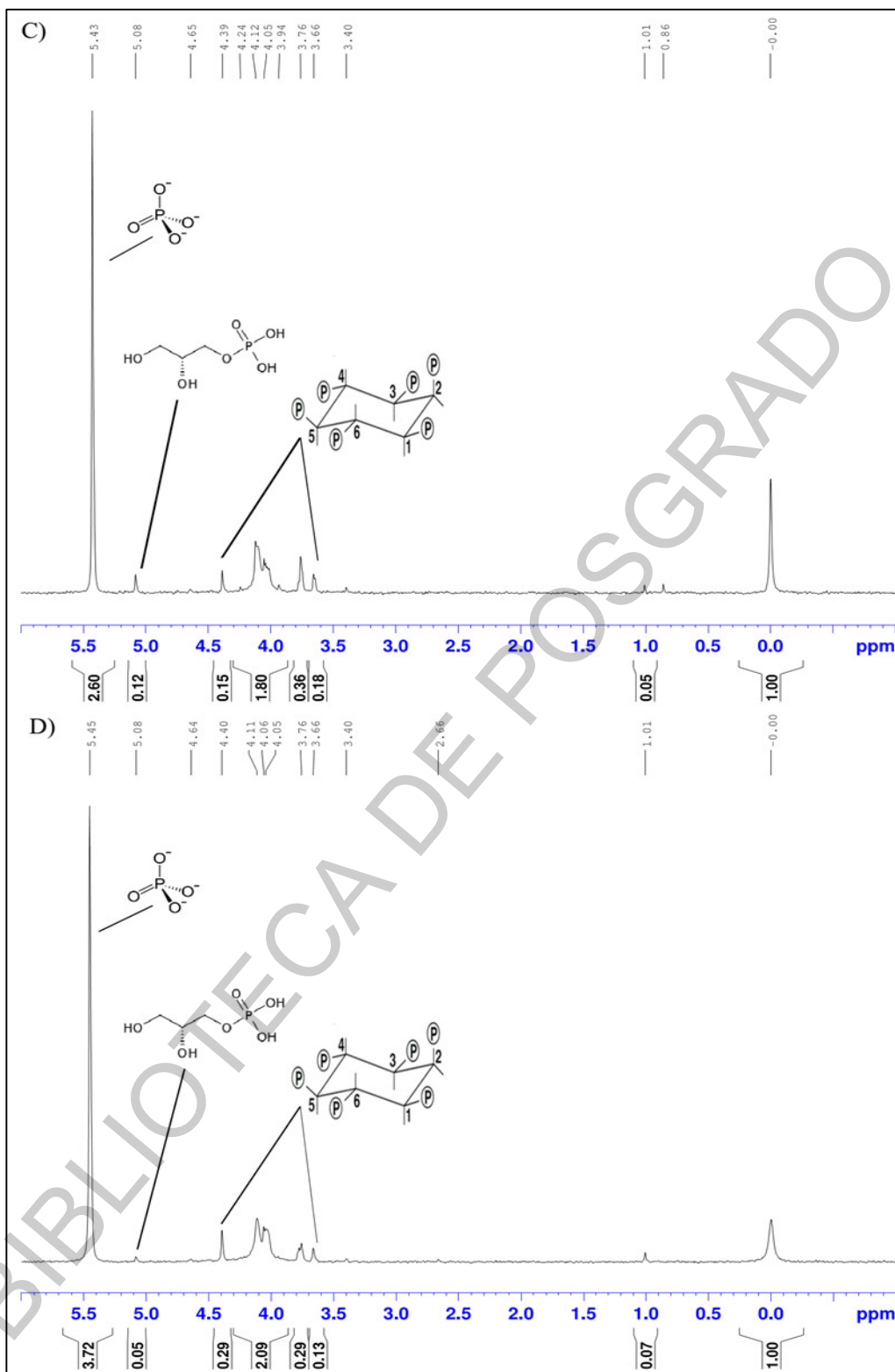


Figura 19. Espectro de NMR ³¹P (Fosfato, glicerol fosfato y fitato) de C) Pulpa y

D) Cáscara de papa Canchan

En la Tabla 6, se presenta la concentración de ácido fítico, glicerol fosfato y fosfato inorgánico en los dos tipos de papa estudiadas, cultivo orgánico (Huagalina) y cultivo convencional (Canchan).

Tabla 6. Contenido^a de fitato, glicerol fosfato y fosfato en papa expresado en g/100 g masa seca

Papa	Fosfato orgánico		Fosfato inorgánico	Fosfato TOTAL
	Fitato	Glicerol fosfato	Fosfato	
Pulpa Huagalina	0.035±0.030	0.031±0.005	0.141±0.009	0.207±0.044
Pulpa Canchan	0.078±0.010	0.026±0.004	0.237±0.022	0.341±0.036
Cáscara Huagalina	0.041±0.006	0.058±0.005	0.207±0.014	0.099±0.025
Cáscara Canchan	0.027±0.006	0.041±0.004	0.272±0.017	0.340±0.027

^a Resultados basados en tres extracciones de un mismo lote de papa liofilizada

Los resultados aquí obtenidos sugieren que la papa cultivada con abono químico, tanto pulpa como cáscara de la papa Canchan, contiene una mayor cantidad total de fósforo que la papa bajo cultivo con abono orgánico, pulpa y cáscara de la papa Huagalina. En particular, resalta el contenido de ácido fítico de la pulpa de la papa Canchan (0.078 %) versus el de la pulpa de Huagalina (0.035 %).

El rol del fósforo en la productividad de los cultivos de papa se encuentra bastante documentado (Sandaña, 2016). Aunque el fósforo se encuentra en forma abundante en muchos suelos muchas veces no está disponible para que lo absorba la planta debido a que este analito forma compuestos insolubles con los cationes,

tanto bajo condiciones ácidas o alcalinas (Vance *et al.*, 2003; Lynch, 2007; Ramaekers *et al.*, 2010; Manchadi *et al.*, 2014). Entre los cultivos, la papa es particularmente sensible a la deficiencia de P en los suelos indicando una baja eficiencia de absorción (Westermann, 2005; Hopkins *et al.*, 2014) y esto se debe al tamaño pequeño de sus raíces en relación a otros cultivos como los cereales y las legumbres (Iwama, 2008). El fósforo es un elemento esencial durante el periodo inicial de desarrollo de la planta y durante su tuberización. La mayor cantidad de fósforo se traslada de la planta hacia los tubérculos por lo que aquella tiene que extraer considerable cantidad de fósforo del suelo. La aplicación de fósforo a ambos lados del tubérculo semilla mejora la absorción de este elemento, disminuyendo la posibilidad de su fijación en el suelo (Egúsqiza, 2012). La evidencia sugiere que los sistemas de cultivos orgánicos producen rendimientos más bajos y variables que los sistemas convencionales con fertilizantes sintéticos y compuestos químicos de protección de cultivos (Smith, 2007).

La determinación de fitatos en papa ha sido abordada en otras investigaciones, a través de métodos distintos de extracción y detección. Wolters *et al.*, (1993) reportan la extracción con HCl y la detección con cromatografía de iones con derivatización post columna y detección UV. Ravindran *et al.*, (1993) realizaron la extracción con ácido tricloroacético y precipitado como fitato férrico y la determinación fue realizada por método colorimétrico de Wheel y Ferrel (1971).

Los autores mencionados reportan concentraciones de 0.02 y 0.18 g /100 g ms de ácido fítico respectivamente. Ninguno de ellos realizó la detección de glicerol fosfato y el fosfato inorgánico. Dada las diferencias entre metodologías de extracción y cuantificación cualquier análisis resulta infructuoso.

La importancia de poder cuantificar el ácido fitico como metabolito aislado es importante pues ya ha sido demostrado que la cocción de la papa no afecta su concentración (Phillipy *et al.*, (2004). Dada la controversia que existe con este metabolito, reportado como antinutriente (Mc Cance & Widdowson, 1942; Prasad *et al.*, 1963) así como antioxidante y anticancerígeno (Prasad *et al.* 1963 ; Graf *et al.*, 1987 ; Shamsuddin, 1995 ; Grasses & Costa- Bauza, 1999) su relación frente al tipo de fertilización debe ser abordada sistemáticamente. La metodología aquí implementada servirá como punto de partida para ello. En este estudio preliminar se ha demostrado que la Canchan (pulpa), cultivo con abono químico, posee casi el doble de ácido fitico que la papa Huagalina (pulpa), cultivo con abono orgánico. Si bien estos resultados son preliminares pues se basan en un muestreo pequeño, indican la factibilidad de un estudio de mayor envergadura.

IV. CONCLUSIONES

La investigación realizada en papa nativa Huagalina demuestra que ésta contiene fitoquímicos reportados en otros estudios como beneficiosos para prevenir enfermedades degenerativas. Se reporta trece (13) compuestos fenólicos detectados por UHPLC-MS/MS, de los cuales cuatro (4) resaltan por encontrarse en mayor concentración (mg/100g ms): ácido clorogénico (510.55 ± 25.04 y 376.81 ± 3.14), ácido neoclorogénico (32.48 ± 2.066 y 99.10 ± 0.58), ácido cafeico (81.61 ± 2.89 y 69.24 ± 1.90) y vainilina (12.18 ± 0.74 y 8.9 ± 0.07) en papa cultivada en ambas localidades estudiadas. No se detectó genisteína ni 7 hidroxil flavona.

De acuerdo al ACP, la mayor concentración de los compuestos fenólicos se encontró en cáscara de papa cruda que en la pulpa tanto en los cultivos realizados en EZ y HA. El 38 % de los metabolitos detectados se encuentran en la cáscara de la papa cultivada en HA; y el 62 % se encuentran en la papa cultivada en EZ.

Este menor porcentaje de metabolitos en la cáscara de HA comparados con la papa cultivada en EZ se podría sugerir que se debe a las condiciones ambientales de EZ y el cultivo orgánico, pero el monitoreo de las condiciones climáticas no fue suficiente en este estudio para identificar si precisamente los factores mencionados fueron responsables de estos cambios.

Los metabolitos encontrados en concentración menor a 1 mg/100 g ms (ácido 3,5 dihidroxil benzoico, cumarina, ácido siríngico ácido *p*- cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, 4 hidroxil-3 metoxil cinamaldehído, diadzeína y 4-hidroxil benzoico) son compuestos también reportados como fitonutrientes (Lewis *et al*, 1999; Ezequiel *et al*. 2013) y dado el alto consumo de la papa en la dieta su cuantificación es importante.

En este estudio se ha visto el efecto de la variedad con relación a su contenido de compuestos fenólicos lo que llevaría a realizar otras investigaciones en otros lugares de los andes y/o implementar programas de mejoramiento a fin de aprovechar su valor funcional expresado en compuestos fenólicos. De esta manera podría considerarse a la papa nativa Huagalina de los andes liberteños como fuente de alelos para el desarrollo de variedades de papa con fitoquímicos que son beneficiosos para la salud humana.

Con respecto a los fosfatos, se realizó la extracción por NaOH- EDTA de los compuestos ^{31}P y por la lectura de estos espectros y sus respectivas integraciones se determinó las áreas de los picos para calcular las concentraciones del ácido fítico, fosfato y el glicerol fosfato que se encuentran en la papa nativa Huagalina (cultivo con abono orgánico) y en la papa comercial Canchan (cultivo con abono químico).

La mayor concentración de ácido fítico se halló en la pulpa Canchan. En relación a las cáscaras se encontró mayor concentración en cáscara Huagalina que en la cáscara de Canchan. No se realizó contrastación con los valores hallados en papa por otros autores porque el método de extracción utilizado, así como el método de determinación de fitatos han sido diferentes que los realizados en esta investigación y no han sido validados aún con otras variedades de papa.

V. PROPUESTA

La papa nativa variedad Huagalina cultivada en Santiago de Chuco ha demostrado que tiene compuestos fenólicos tanto en su cáscara como en la pulpa, siendo, el ácido clorogénico y sus isómeros, los que se encuentran en mayor proporción. Es muy importante continuar con trabajos de investigación monitoreando compuestos bioactivos como éstos, que tienen efectos positivos para la salud y así como también los nocivos, posiblemente los fitatos, que pueden afectar la salud (por la facilidad que tiene de acomplejarse con otros cationes como el fierro) por el alto y continuo consumo del tubérculo. Se debe por tanto contar con metodología cuantitativa basada en NMR para un análisis rápido y directo.

Los avances tecnológicos en la manipulación de los cultivos y el conocimiento científico de fitoquímicos en la papa, debe dar lugar a programas de mejoramiento para promover la salud. La optimización de la composición química de la papa, facilitado por la identificación del perfil metabólico de las papas peruanas promisorias, podría ser un método muy rentable de prevención de enfermedades puesto que las mejoras de salud inducidas por la dieta no llevarían ningún costo añadido. Teniendo como resultado los perfiles metabólicos de cáscara y pulpa cruda y cocida se podría re-direccionar, si fuera el caso, el consumo mediante campañas para aprovechar las cualidades medicinales, o evitar las propiedades anti-nutritivas (alto contenido de fitatos) que podrían tener estos compuestos en la cáscara. El efecto del tipo de cocción sobre este último compuesto es de vital importancia.

El monitoreo detallado de los cultivos en cuanto a tipo de suelo, altitud y condiciones climatológicas debería llevar a concluir cuales son las zonas más promisorias del ande peruano y esto se debería hacer con los perfiles metabolómicos por NMR de las variedades nativas.

La evaluación del tipo de cocción que evita la pérdida de estos compuestos es importante y también evaluar científicamente el agua proveniente de la papa hervida puesto tenemos antecedentes que se usa como medicina folclórica.

La papa nativa variedad Huagalina cultivada en Santiago de Chuco ha demostrado que tiene compuestos fenólicos tanto en su cáscara como en la pulpa, siendo el ácido clorogénico y sus isómeros los que se encuentran en mayor proporción. Es muy importante continuar con trabajos de investigación monitoreando los compuestos bioactivos que tienen efectos positivos para la salud y los que pueden afectarla por el consumo continuo del tubérculo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Referencias

- Aharoni, A., Ric de Vos, C., Verhoeven, H., Maliepaard, C., Kruppa, G., Bino, R., & Goodenowe, D. (2002). Non-targeted metabolome analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *OMICS*, *6*, 217-234.
- Aisala, H., Sinkkonen, J., Kalpio, M., Sandell, M., This, H., A., & Hopia, A. (2016). In situ quantitative ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy discriminates between raw and steam cooked potato strips based on their metabolites. *Talanta*, *161*, 245-252.
- Al-Saikhan, M., Howard, L., & Miller, J. (1995). Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Food Sci.*, *60*, 341-343.
- Álvarez, M. (2001). Oportunidades para el Desarrollo de Productos de Papas Nativas en el Perú. . *Revista Latinoamericana de la papa. Vol-especial: 58-79* , *Vol-especial*, 58-79.
- André, C., Oufir, M., Hoffmann, L., Hausman, J., Rogez, H., Larondelle, Y., & Evers, D. (2009). Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, *22*, 517-524.
- Bassoli, L., Hale, A., Cassolla, P., Borba-Murad, G., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C., . . . de Souza, H. (2008). Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: Effect on hepatic glucose release and glycemia. *Cell Biochem Funct.*, *26*, 320-328.
- Bianeth, C., & Restrepo, L. (2013). Compuestos fenólicos y carotenoides en la papa: Revisión. *Actualización en Nutrición Vol 14-N°1.*, *14*(1).
- Blessington, T., Nzaramba, M., Scheuring, D., Hale, A., Reddivari, L., & Miller Jr., J. (2010). Cooking methods and storage treatments of potato: effects on carotenoids, antioxidant activity and phenolics. *American Journal of Potato Research*, *55*, 10830-10849.
- Brennan, L. (2014). NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research. . *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *83*, 42-49.
- Brown, C., Culley, D., Yang, C., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005). Variation of anthocyanin and carotenoid contents and associated antioxidant values in potato breeding lines. *J.Am. Soc. Hort. Sci.*, *130*(2), 174-180.
- Brush, S., Kessel, R., Ortega, R., Cisneros, P., Zimmerer, K., & Quiros, C. (1995). Conservation Biology. *Conservation Biology*, *9*(5), 1189-1198.

- Buono, V., Paradiso, A., Serio, F., Gonella, M., & De Gara, L. (2013). Tuber quality and nutritional components of early potato subject to chemical haulm desiccation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 556-562.
- Bureau, S., Renard, C., Reich, M., Ginies, C., & Audergon, J. (2009). Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *Food Science and Technology*, 42, 372-377.
- Burgos, G., Amoros, W., Muñoa, L., Sosa, P., Cayhualla, E., Sanchez, C., & Bonierbale, M. (2013). Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30, 6-12.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M., & Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3337-3340.
- Buskanov, S. (1971). *Flora of cultivated potato* (Vol. 9). Kolos, Leningrad, Russia: Bukasov.
- Camire, M., Kubow, S., & Donnelly, D. (2009). Potatoes and Human Health. *Food Sci. Nutr.*, 49, 823-840.
- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 297.
- Chu, Y., Chang, C., & Hsu, H. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.
- Chun, O.K., Kim, D.O, Smith, N., Schroeder, D., Han J.T., & Lee, C.Y.,. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J.Sci.Food Agri.*, 85, 1715-1724.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità(43)*, 348-361., 43, 348-361.
- De Jager, L., Perfetti, G., & Diachenko, G. (2007). Determination of coumarin, vanillin and ethyl vanillin in vanillina extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. *Journal of Chromatography*, 1145, 83-88.
- Defernez, M., Gunning, Y., Parr, A., Shepherd, L., Davies, H., & Colquhoun, I. (2004). NMR and HPLC-UV Profiling of Potatoes with Genetic Modifications to Metabolic Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6075-6085.
- Deuber, H., Guignard, C., Hoffmann, L., & Evers, D. (2012). Polyphenol and glycoalcaloid contents in potato cultivars grown in Luxemburg. *Food Chemistry*, 135, 2814-2824.

- Dobson, G., Shepherd, T., Verrall, S., Griffiths, W., Ramsay, G., McNicol, J., . . . Stewart, D. (2010). A metabolomic study of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) Groups Andigena, Phureja, Stenotomun, and tuberosum using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1214-1223.
- Egúsqüiza, M. (2012). *Manual técnico para producción de papa en la sierra*. Lima.
- Elzbieta, R. (2012). The effect of industrial potato processing on the concentration of glicoalkaloids and nitrates in potato granules. *Food Control*, 28, 380-384.
- Ezequiel, R., Sing, N., Sharma, S., & Kaur, A. (2013). Beneficial phytochemicals in potato- A review. *Food Research International*, 50, 487-496.
- FAOSTAT. (2014). www.fao.org/faostat. (F. a. Nations, Productor)
- Feil, B., & Fossati, D. (2001). *Food phytates*. (N. Rukma, & S. Sathe, Edits.)
- Feng, R., Lu, Y., Bowman, L., Qian, Y., Castranova, V., & Ding, M. (2005). Inhibition of activator protein-1, NF-kappa B and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.*, 289(30), 27888-27895.
- Ferreira, D., & Li, X. (2000). Oligomeric proanthocyanidins: Naturally occurring O-heterocycles. *Natural Product Report*(17), 193-212. *Natural Product Report.*, 17, 193-212.
- Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and byochemical modeling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics*, 2, 155-68.
- Friedman, M. (1997). Chemistry ,biochemistry and dietary role of potato polyphenols. A rewiew. *J.Agri. Food Chem.*, 45, 1523-1540.
- Friedman, M., Kozukue, N., Kim, H., & Choi, M. (2017). Glycoalcaloid, phenolic and flavanoid content and antioxidant activities of conventional non organic and organic potato peel powders from commercial gold, red and Russet potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.019>
- Giusti, M., Polit, M., Ayzav, H., Tay, D., & Manrique, I. (2014). Characterization and Quantification of Anthocyanins and Other Phenolics in Native Andean Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4408-4416.
- Glassbrook, N., & Ryals, J. (2001). A systemic approach to biochemical profiling. *Curr. Opin. Plant Biol.* , 4, 186-190.
- Graf, E., Empson , K., & Eaton, J. (1987). Phytic Acid- A natural antioxidant. *J. Biol.Chem.*, 262, 11647- 11650.
- Grasses, F., & Costa- Bauza, A. (1999). Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids useful in renal litiasis treatment. *Anticancer Res.*, 19, 3717- 3722.

- Griffin, J. (2004). Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterization of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. . *Curr Opin Chem Biol.*, 7, 648-654.
- Hagerman, A. (2002). *Tannin Handbook*. Miami University, USA.: Department of Chemistry and Biochemistry.
- Hamouz, K., Lachman, J., Parderul, K., Tomásek, K., Hejtmánková, K., & Pivec, V. (2011). Differences in anthocyanin content and antioxidant activity of potato tubers with different flesh colour. *Plant Soil. Environ.*, 57(10), 478-485.
- Hawkes, J. (1990). *The potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven, London.
- He, J., & Giusti, M. (2010). Anthocyanins : natural colorants with health- promoting properties. *Ann. Rev. Food Sci. Technology*, 1, 163-187.
- He, Y., Yang, L., & Wang, Z. (2010). A rapid assay for angiotensin- converting enzyme activity using ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 24(3), 312-317.
- Hijmans, R. (2003). The effect of climate change on global potato production. American Journal of potato research. 80, 271-280. *American Journal of potato research.*, 80, 271-280.
- Hopkins, B., Horneck, D., & MacGuidwin, A. (2014). Improving phosphorus use efficiency through potato rhizosphere modification and extension. *Am.J. Potato Res.*, 91, 161-174.
- Huaman, Z., & Spooner , D. (2002). *Am.J.Bot.* (Vol. 89).
- ICH. (1996). International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures. Geneva, Switzerland.
- Idborg-Bjorkman, H., Edlund, P., Kvalheim, O., Schuppe-Koistinen, I., & Jacobsson, S. (2003). Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionisation-MS and two-way data analysis. *Anal Chem* 75, 4784-4792. *Anal Chem* 75, 4784-4792, 75, 4784-4792.
- Ieri, F., Innocenti, M., Andrenelli, L., Vecchio, V., & Mulinacci, N. (2011). Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolic acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and correlations with variety and geographical origin. *Food Chemistry*, 125, 750-759.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*(126), 1821–1835. *Food Chemistry.*, 126, 1821-1835.
- Im, H., Suh, B., Lee, S., Kozukue, N., Ohnishi-Kameyama, M., & Levin, C. (2008). Analysis of phenolic compounds by High Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography/Mass spectrometry in potato plant flowers , leaves, stem and tubers and in home-processed potatoes. *J. Agri. Food Chem.*, 56, 3341-3349.

- INEI, I. (2013). *Resultados Definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2013 - La Libertad*. Lima.
- Iversen, C. (1999). Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. . *Journal of Food Science*, 64, 3741.
- Iwama, K. (2008). Physiology of the potato : New insights into root system and repercussions for crop management . *Potato Res.*, 51, 333-353.
- Jaganath, I., & Crozier, A. (2010). *Dietary flavonoids and phenolics compounds.Plantphenolics and human health*, 1-49.
- Jin, U., Lee, J., Kang, S., Kim, J., Park, W., Kim, J., . . . Kim, C. (2005). A phenolic compound, 5- caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Eunonymus alatus*. *Life Sci.*, 77, 2760- 2769.
- Johanningsmeier, S., Harris, G., & Klevorn, M. (2016). Metabolomic Technologies for Improving the Quality of food: Practice and PromiseA. *The Annu. Rev. Food. Sci. Tecnolo.* , 7, 19.1-19.26.
- Jung, J., Lim, E., Lee, Y., Kang, J., Kim, H., Jang, S., & Jung, M. (2009). Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects.*Journal of Medicinal Chemistry*(44), 3166-3174. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 3166-3174.
- Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Dacuscarota* ssp. *Sativus* var. *atrorubens*Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219, 479-486.
- Kaspar, K., Park, J., Brown, C., Mathison, B., & Navarre, D. (2011). Pigmented potato consumption alters oxidative stress and inflammatory damage in men. *J. Nutr.* , 141, 108-111.
- Kaspar, K., Park, J., Brown, C., Weller, K., Ross, C., Mathison, B., & Chew, B. (2013). Sensory evaluation of pigmented flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Nutr. Sci.*, 4, 77-81.
- Khanbabaee, K., & Ree, T. (2001). Tannins: Classification and definition. *Natural Product Report*(18), 641-649., 18, 641-649.
- Kim, H., Choi, Y., & Veerporte , R. (2011). NMR- based metabolomic analysis of plant.Where do we stand, where do we go ? *Trends. Biotech.*, 29, 267-75.
- King, R., & Calhoun, L. (2012). Complete 1H and 13C NMR spectral assignments for the glycoalkaloid dehydrocommersonine. *Mag. Reson.Chem.*
- Klejdus, B., Vacek, J., Benešová, L., Kopecky, J., Lapčík, O., & Kubán, V. (2007). Rapid resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 2277-2285.

- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins-more than nature colours. *Journal of Biomedicine and. Biotechnology*, 5, 239-240.
- Kris-Etherton, P., Lefevre, M., Beecher, G., Gross, M., Kenn, C., & Etherto, T. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. . *Annual review of nutrition* , 24, 511-538.
- Krishnan , P., Kruger, N., & Ratcliffe, R. (2005). Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMr. *J. Exp. Bot.* , 56, 255-65.
- Kubow, S., Hobson, L., Iskandar, M., Sabally, K., Donnelly, D., & Agellon, L. (2014). Extract of Irish potatoes (*Solaanum tuberosum* L.) decreases body weight gain and adiposity and improves glucose control in the mouse model of diet -induced obesity. . *Mol. Nutr. Food. Res.*, 58(11), 2235-2238.
- Kubow, S., Hobson, L., Iskandar, M., Sabally, K., Donnelly, D., & Agellon, L. (2014). Extract of Irish potatoes (*Solanum tuberosum* L.) decreases body weight gain and adiposity and improves glucose control in the mouse model of diet-induced obesity. *Mol. Nutr.Food Res.*, 58(11), 2235-2238.
- Kumar, T., Balammal, G., & Kumar, A. (2012). Ultra performance liquid chromatography: an introduction and review. *International Journal of Pharmaceutical. Research & Analysis*. 2(1): 24-31. *International Journal of Pharmaceutical. Research & Analysis*. 2(1): 24-31., 2(1), 24-31.
- Kumar, V., Sinha, A., Makkar, H., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition : A review. *Food Chemistry*, 120, 945-959.
- Lapornik, B., Prosek, M., & Golc, W. A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering(71)*, 214–222., 71, 214-222.
- Lechnovich, V. (1971). *Flora of cultivated potato*. Kolos, Leningrado, Russia: Buskasov Sm.
- Lee do, Y., Bowen, B., & Northen, T. (2010). Mass spectrometry–based metabolomics, analysis of metabolite-protein interactions, and imaging. *BioTechniques*, 49(2):557-565. *BioTechniques*, 49(2), 557-565.
- Lee, S., Park, H., Chung, H., & Cho, S. (2006). Dietary Phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice . *Nutr. Res.* , 26, 474- 479.
- Lindon, J., & Nicholson, J. (2014). The emergent role of metabolomic phenotyping in dynamic patient stratification. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10, 915-919.
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A., Cerretani, L., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2014). Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAS-q-TOF and study of their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1-11.

- Lovat, C., Nassar, A. M., Kubow, S., Li, X. Q., & Donnelly, D. J. (2015). Metabolic Biosynthesis of Potato (*Solanum tuberosum* L. Antioxidants and implications for human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi:10.1080/10408398.2013.830208
- Lynch, J. (2007). Roots of the second green revolution. *Aust. J. Bot.*, 55, 493-512.
- Ma, Y., Tanaka, N., Vaniya, A., King, T., & Fiehn, O. (2016). Ultrafast polyphenol metabolomics of red wines using Micro LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 505-512.
- Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science*, 65, 26-40.
- Manchadi, A., Kaul, H., Vollman, J., Eitzinger, J., & Wenzel, W. (2014). Reprint of developing phosphorus-efficient crop varieties -an interdisciplinary research framework. *Field Crops Res.*, 165, 49-60.
- Mattila, P., & Hellstrom, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152-160.
- Mc Cance, R., & Widdowson, E. (1942). Mineral Metabolism of healthy adults on White and brown dietaries. *J. Physiology*, 101, 44-85.
- McGill, C., Kurilich, A., & Davignon, J. (2013). The role of potatoes and potato components in cardiometabolic health: A review. *Ann. Med.* , 45, 467-473.
- MINSA. (2009). Tablas peruanas de composicion de. Lima: Centro de informacion y documentacion cientifica del INS.
- Monro, J., & Mishra, S. (2009). Nutritional Value of Potatoes: Digestibility, Glycemic Index and Glycemic Impact. *Potato Chemistry and Technology* (First Edit.,pp371-394. Elsevier. Ltd. *Advances in Potato Chemistry and Technology, First Edit*, 371-394.
- Morris, W., Ducreux, L., Griffiths, D., Stewart, D., Davies, H., & Taylor, M. (2004). Carotogenesis during tuber development and storage in potato. *J. Exp. Bot.* , 399, 975-982.
- Mulinacci, N., Leri, F., Giaccherini, C., Innocenti, M., Andrenelli, L., & Canova, G. (2008). Effect of cooking on the anthocyanins, phenolic acids, glycoalkaloids and resistant starch content in two pigmented cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Agri. Food Chem.*, 56, 11830-11837.
- Narváez- Cuenca, C. E. (2013). *Hydroxycinnamoyl conjugates in potato tubers Diversity and reactivity upon processing*. Wagenin University, Holanda.
- Narváez-Cuenca, C., Vincken, J., & Gruppen, H. (2012). Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC-DAS-ESI-MS. *Food Chemistry*, 130, 730-738.

- Narváez-Cuenca, C., Vincken, J., Zheng, C., & Gruppen, H. (2013). Diversity of (dihydro) hydrocynamic acid conjugates in Colombian potato tubers. *Food Chemistry*, 139, 1087-1097.
- National Academy of Science. (1998). *Dietary Reference Intakes : Proposed Definition an Plan for Review of Dietary Antioxidants and Related Compounds*. Washington, D.C.: National Academic Press,.
- Navarre, A. (2009). Nutritional Value of Potatoes: Vitamin, phytonutrient and Mineral Content. . *Advances in Potato Chemistry and Technology (First Edit)* .
- Navarre, D., Pillai, S., Shakya, R., & Holden, M. (2011). HPLC profiling of phenolics in diverse potato genotypes. *Food Chemistry*, 34-41.
- Neciosup, J. (2009). *La Libertad; análisis de situación en población. Fondo de Población de las Naciones Unidas, UNFPA - Consorcio de Investigación Económica y Social, CIES*. . Ediciones Nova Print S.A.C. Elsevier Ltd. . doi:Doi:10.1016/B978----0-12-374349-7.00014-3
- Noack, S., Mc Laughin, M. J., Smernick, R., McBeath, T., & Armstrong, R. (2012). Crop residues phosphorus: Speciation and potential bio-availability. *Planta and Soil*, 359, 375-385.
- Novoa-Carballal, R., Fernandez-Megia, E., Jimenez, C., & Riguera, R. 2.-9. (2011). NMR methods for unravelling the spectra of complex mixtures. *Natural Product Reports*, 28(1): 78-98. *Natural Product Reports*, 28(1): 78-98., 28, 78-98.
- Nzaramba, M., Reddivari, L., Bamberg, J., & Miller, J. (2009). Antiproliferative activity and cytotoxicity of *Solanum jamesii* tuber extracts on human colon and prostate cancer cells in vitro. *J. Agri. Food. Chem.*, 57(18), 8308-8315.
- Ochoa , C. (1999). *Las papas en Sudamerica : Perú. Part I*. Lima, Perú: International Potato Center.
- Ochoa, C. (1990). *The potatoes of South America*. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press.
- Oghogho Ebuele, V., Santoro, A., & Vera, T. (2016). Characterization of plant seeds by Phosphorus- 31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analytical letters*. doi:10.1080/00032719.2016.1206910
- Pacifico, D., Casciani, L., Ritota, M., Mandolino, G., Onofri , C., & Moschella, A. (2013). NMR-based metabolomics for organica farming traceabiliy of early potatoes. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 410-412.
- Pham-Tuan, H., Kashavelis, L., Daykin, C., & Janssen, H. (2003). Method development in high-performance liquid chromatography for high throughput profiling and metabonomic studies of biofluid samples. *J. Chromatogr .*, 789B, 283-301.
- Phillipy, B., Lin, M., & Rasco, B. (2004). Analysis of phytate in raw and cooked potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 217-226.

- Plumb, R., Stumpf, C., Gorenstein, M., Castro-Perez, J., Dear, G., Anthony, M., . . . Haselden, J. (2002). Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16: 1991-1996., 16, 1991-1996.
- Plumb, R., Stumpf, C., Granger, J., Castro-Perez, J., Haselden, J., & Dear, G. (2003). Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 17, 2632-2638.
- Prasad, A., Miale, A., Farid, Z., & Sandstead, H. (1963). Biochemical studies on dwarfism and anemia. *Arch. Int. Med*, 111, 407- 428.
- Quanyi, W., Qin, C., Maalong, H., Priya, M., Junying, S., & Qing, Y. (2011). Inhibitory effect of antioxidant extracts from various potatoes on the proliferation of human colon and liver cancer cells. *Nutr.Cancer*, 63(7), 1044-1052.
- Raboy, V. (2003). Molecules of interest myo- inositol-1,2,3,4,5,6- hexakisphosphate. *Phytochemistry* , 64, 1033-1042.
- Ramaekers, L., Remans, R., Rao, I., Blair, M., & Vanderleyden, J. (2010). Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. *Field Crops Res.*, 117, 169-176.
- Ravindran, V., Ravindran, G., & Sivalogan, S. (1994). Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chemistry*, 50, 133-136.
- Reddivari, L., Hale, A., & Miller, J. (2007). Determination of phenolic content , composition and their contribution to antioxidant activity in specialty potato selection. *Am.J.Potato Res.*, 84(4), 275-282.
- Reo, N. (2002). NMR-based metabolomics. *Drug Chem Toxicol* , 25, 375-382.
- Romero, R., Fernández, J., Plaza, P., Garrido, A., & Martínez, J. (2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Rev Esp Salud Pública*, 81, 461-474.
- Saleem, M., Kim, H., Ali, M., & Lee, Y. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*, 22, 696-716.
- Sandaña, P. (2016). Phosphorus uptake and utilization efficiency in response to potato genotype and phosphorus availability. *European Journal of Agronomy*, 76, 95-106.
- Sandaña, P., & Kalazich, J. (2015b). Ecophysiological determination of tuber yield as affected by potato genotype and phosphorus availability. *Field Crop Res.*, 180, 21-28.
- Santos, C., Cunha, S., & Casal, S. (2015). Bioactive Components in Potatoes as Influenced by Thermal Processing. En V. Preedy, *Processing and Impact on Active Components in Food* (págs. 111-119). Elsevier Inc.

- Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R., & Grases, F. (2009). Review: Phytate in foods and significance for humans: Food Sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. . *Mol. Nutr. Food. Res.*, *53*, S330-S375.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in food, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of functional foods*(18), 820-897., *18*, 820-817.
- Shahidi, F., & Chandrasekara, A. (2010). Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochemistry Review* , *9*, 147-170.
- Shahidi, F., & Naczk, M. 2. (2004). Shahidi, F.; Naczk, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-558. *Shahidi, F.; Naczk, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-558.*
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals.* . Boca Raton, FL: CRC Press, 1-558.
- Shahidi, F., McDonald, J., Chandrasekara, A., & Zhong, Y. (2008). Phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars: Chemistry and health effects. . *Journal of Clinical Nutrition.*, *17*, 3680-382.
- Shamsuddin, A. (1995). Inositol phosphates have novel anticancer function. . *J. Nutri.* , *125*, 725S- 7232S.
- Sing, N., Kamath, V., & Rajini, P. (2005). Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ- induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. . *Clin.Chim. Acta* , *353*(1-2), 165-175.
- Sinha, A., Sharma, U., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanillina flavor extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Food Science and Nutrition*, *59*, 299-236.
- Smith, R. M. (2007). Temporal yield variability under conventional and alternative management systems. . *Agronomy Journal* , *99*, 1629-1634.
- Spooner, D. M., Mc Lean, K., Ramsay, G., Waught, R., & Bryan, G. J. (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *PNAS*, *102*(41), 14694-14699.
- Spooner, D. M., Nuñez, J., Trujillo, G., Herrera, M., Guzman, F., & Ghislan, F. (2007). Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *PNAS*, *194*(49), 19398-19403.
- Styles, P., & Soffe, N. (1984). A high-resolution NMR probe in which the coil and preamplifier are cooled with liquid helium. *Journal of magnetic resonance* , *60*, 397-404.
- Subar, A. F., Krebs-Smith, S. M., Cook, A., & Khale, L. L. (1998). Dietary source of nutrients among US adults, 1989 to 1991. *J. Am. Diet. Assoc.*, *98*, 537-547.

- Thompson, L., Button, C., & Jenkins, D. (1987). Phytic acid and calcium affect in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. *Am.J.Clin. Nutr.*, 46, 467-473.
- Thompson, M., Thompson, H., McGinley, J., Neil, E., Rusk, D., Holm, D., & Stushnoff, C. (2009). Functional food characteristics of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.): phytochemical composition and inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced breast cancer in rats. *J. Food. Comp. Anal.*, 22(6), 571-576.
- Tomita, S., Ikeda, S., Tsuda, S., Someya, S., & Asano, K. (2017). A survey of metabolomic changes in potato leaves by NMR-based metabolomic profiling in relation to resistance to late blight disease under field conditions. Short title: NMR metabolic profiling for predicting potato late blight resistance. *Magn. Reson. Chem.*, 55, 120-127.
- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A., & Plou, F. (2010). Regioselective lipase-catalyzed synthesis of 3-O-acyl derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(58), 807-813, 58, 807-813.
- Tsao, R., & Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*(, 1018, 29-40.
- Vance, C., Ehde-Stone, C., & Allan, D. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.*, 157, 423-447.
- Virgili, F., & Scaccini, C. (2003). *Nutritional phenolics and cardiovascular diseases*. In :Johnson, I., G. Williamson, E (Eds.). *Phytochemical Functional Foods*. Woodhead, Cambridge, UK, 5-17.
- Weckwerth, W., & Fiehn, O. (2002). Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Curr Opin Biotechnol* 13: 156-160, 13, 156-170.
- Westermann, D. (2005). Nutritional requirements of potatoes. *Am.J. Potato Res.*, 82, 301-307.
- Whitfield, P., German, A., & Noble, P. (2004). Horizons in Nutritional Science. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. *British Journal of Nutrition*, 92, 549-555.
- Wink, M. (2010). Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annu. Plant Rev.*, 40, 1-19.
- Winning, H., Roldán-Marín, E., Dragsted, L., Viereck, N., Poulsen, M., Sánchez-Moreno, C., . . . Engelsen, S. (2009). An exploratory NMR nutri-metabonomic investigation reveals dimethyl sulfone as a dietary biomarker for onion intake. *Analyst.*, 134, 2344-2351.

- Wishart, D., Guo, A., Wilson, M., Knox, C., & Jewison, T. e. (2013). HMDB 3.0: The human metabolome database in 2013. *Nuclei Acids Res.* , 41: D801-7.
- Wolters, M., Diepenmaat, H., Hermus, R., & Voragen, A. (1993). Relation between In vitro availability of minerals and food composition: A mathematical model. *Journal of Food Science*, 58(6), 1349-1355.
- Wu, Z., Li, M., Zhao, C., Zhou, J., Chang, Y., Li, X., . . . Xu, G. (2010). Urinary metabonomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass . *Mol. Biosyst* , 6, 2157-2163.
- Yeo, J., & Shahidi, F. (2015). A critical evaluation of changes in the ratio of insoluble-bound to soluble phenolics on antioxidant activity of lentils during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 379-381.
- Yoon, S., Rhee, Y., Lee, E., Lee, M., Ahn, K., Lim, H., & Kim, S. (2008). Uncoupled protein 3 and p38 signal pathways are involved in antiobesity activity of Solanum tuberosum L. cv. Bora Valley. *J.Ethnopharmacol*, 118(3), 396-404.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Zhang, A.; Sun, H.; W Modern analytical techniques in metabolomics analysis. . *Analyst* www.rsc.org/analyst;; 137, 293-300.
- Zhang, Z., Luo, J., Wang, J., & Kong, L. (2013). Five new steroidal alkaloid glycosides from Solanum tuberosum. *Helvetica Chimica Acta*, 96, 931-940.

ANEXOS

BIBLIOTECA DE POSGRADO

Anexos I

Tabla 1. Curvas de calibración 1-500 ng/mL

Iones	Metabolito	Concentración ng/ mL					
		1	10	50	100	250	500
		A r e a					
155.02/137.010	Ácido 3,5 Dihidroxi benzoico	30	86	416	941	2173	3968
353.10/179.000	Ácido neochlorogénico	106	830	3866	7521	18788	37787
355.00/163.00	Ácido clorogénico	662	4104	18149	25709	65822	130862
139.12/121	Ácido 4- hidroxibenzoico	31	286	1309	2494	5827	9898
179.00/135	Ácido cafeico	163	4104	6483	12767	30283	57851
197.00/121.2	Ácido siríngico	20	205	964	1837	4243	7381
151.00/92.00	Vainillina	70	382	1602	3088	7270	13896
163.04/119.0	Ácido p-cumárico	309	2916	13888	26913	62991	117389
193.00/134.0	Ácido ferúlico	47	467	2105	4024	9128	16951
223.00/164.1	Ácido sinápico	63	468	2107	3989	9708	17784
179.00/147.04	4-hidroxi -3- metoxi cinamaldehido	1030	9837	43957	79911	169587	285487
147.06/91.0	Cumarina n	608	5144	24161	47912	111846	213577
255.00/199.0	Daidezeína	255	2445	10894	20194	43243	73725
271.00/243.0	Genisteína	40	339	1811	3553	8202	15037
239.07/137.0	7-hidroxi – lavona	117	1103	5494	10509	25307	47794

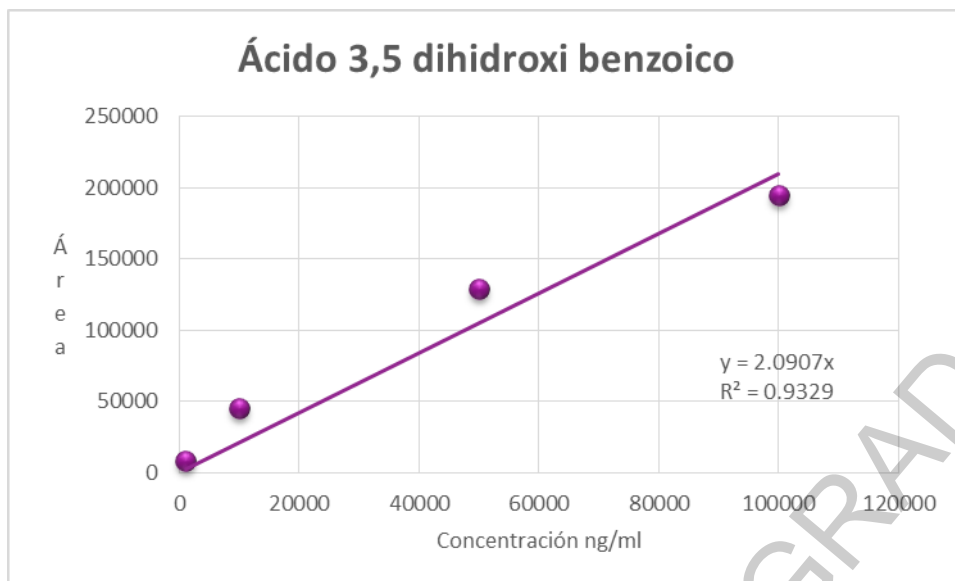


Figura 1. Curva de calibración del ácido 3,5 dihidroxi benzoico

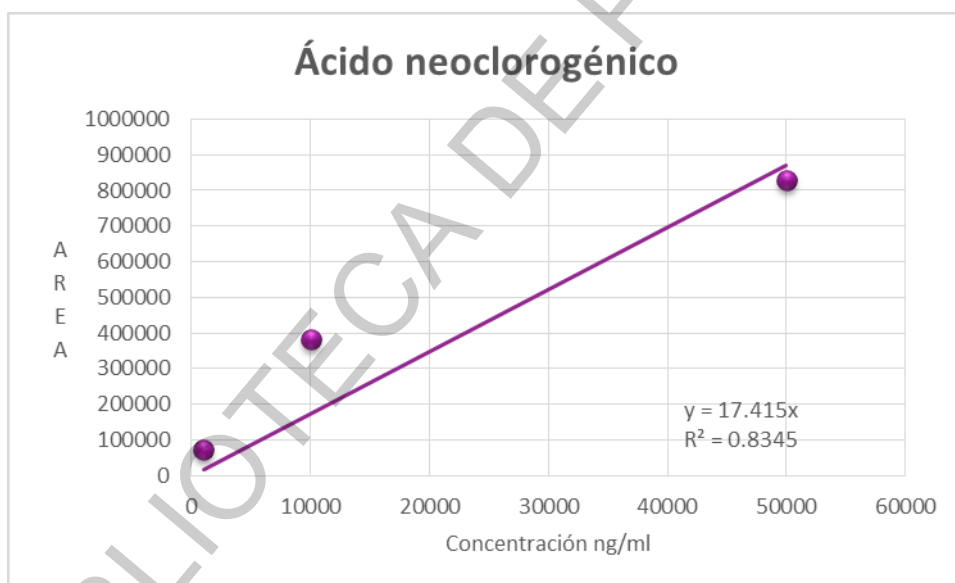


Figura 2. Curva de calibración del ácido neoclorogénico

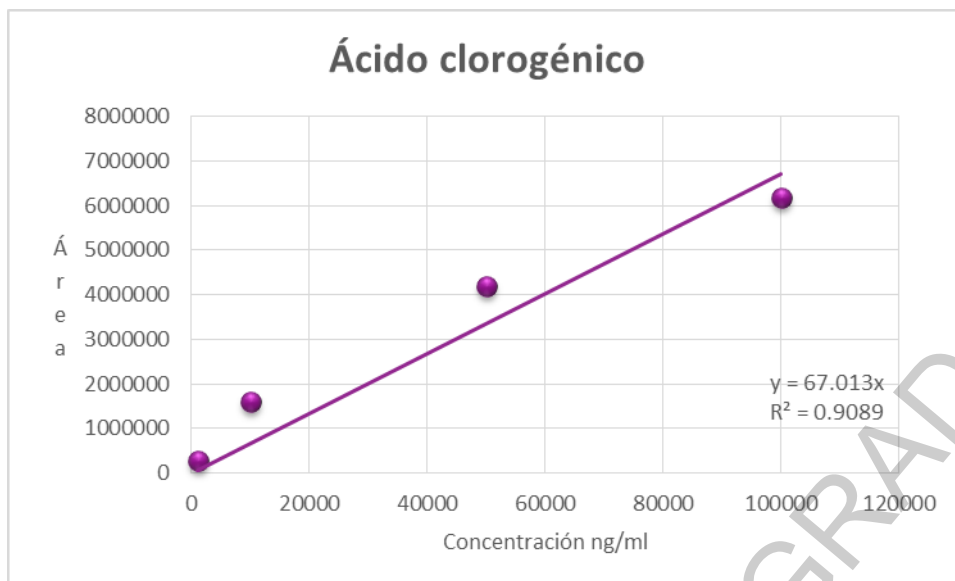


Figura 3. Curva de calibración del ácido clorogénico

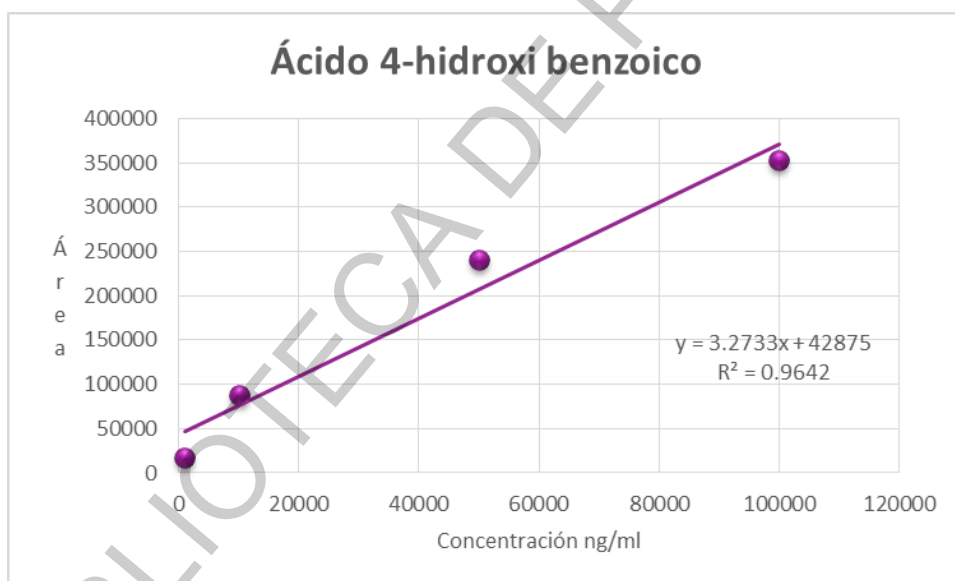


Figura 4. Curva de calibración del ácido 4- hidroxi benzoico

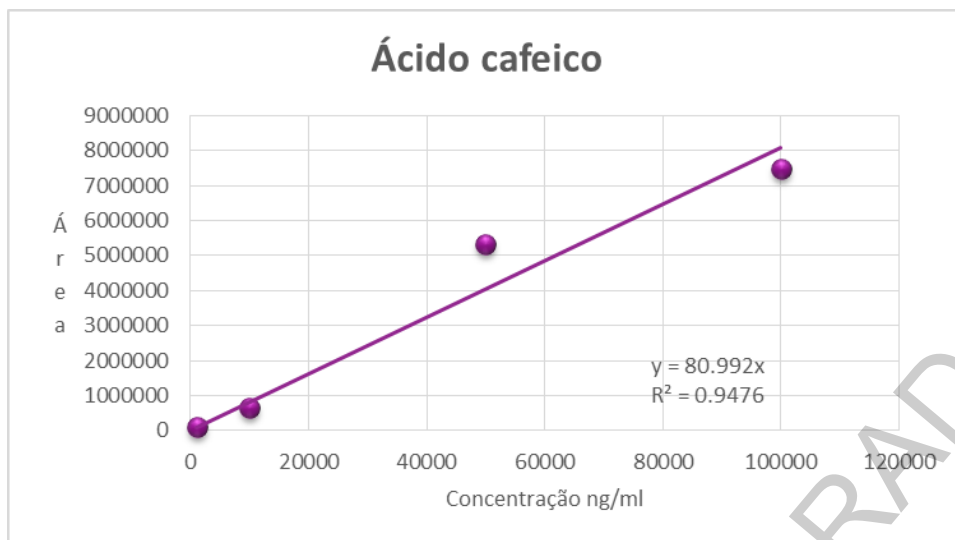


Figura 5. Curva de calibración del ácido cafeico

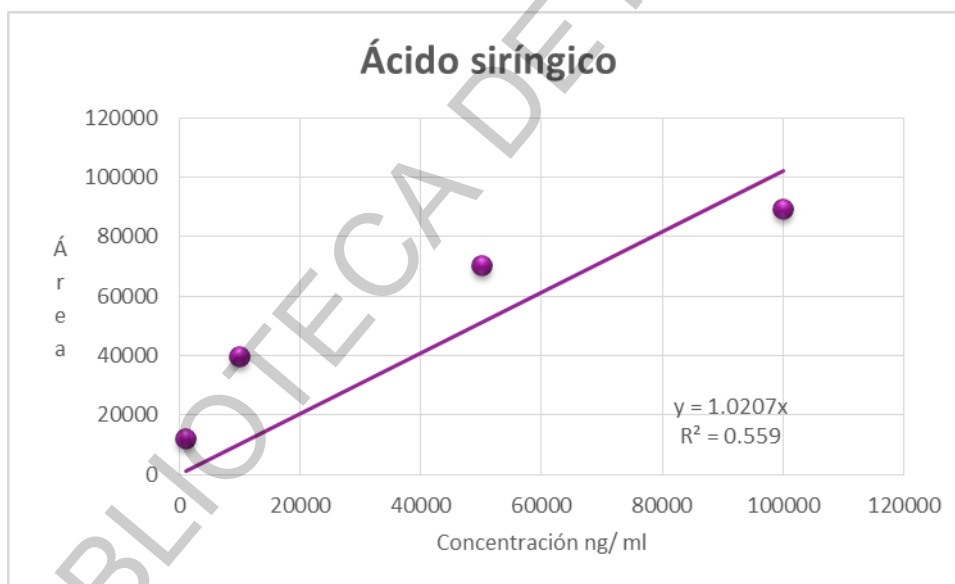


Figura 6. Curva de calibración del ácido siríngico

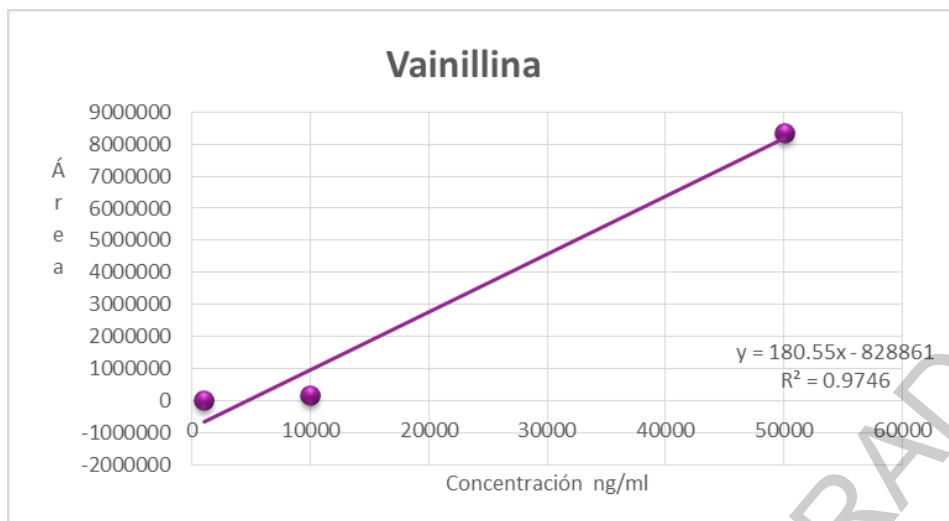


Figura 7. Curva de calibración de vainillina

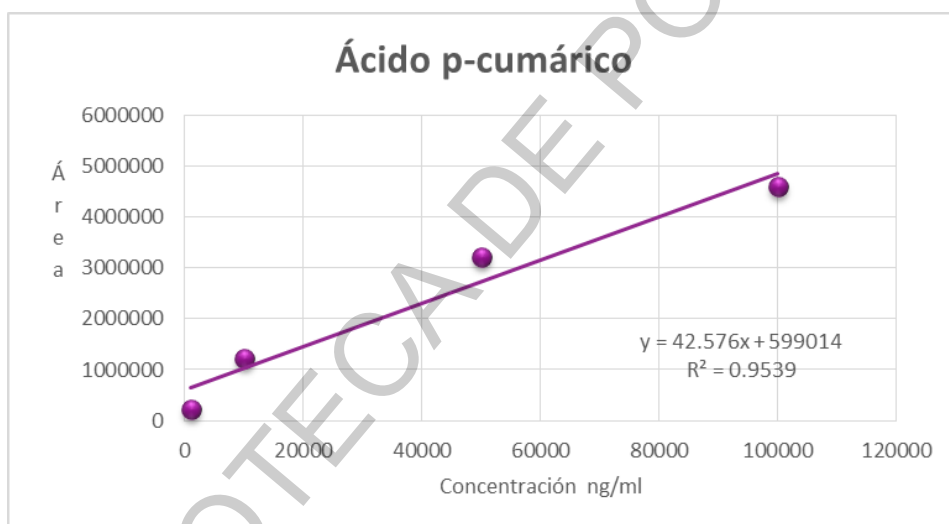


Figura 8. Curva de calibración del ácido *p*-cumárico

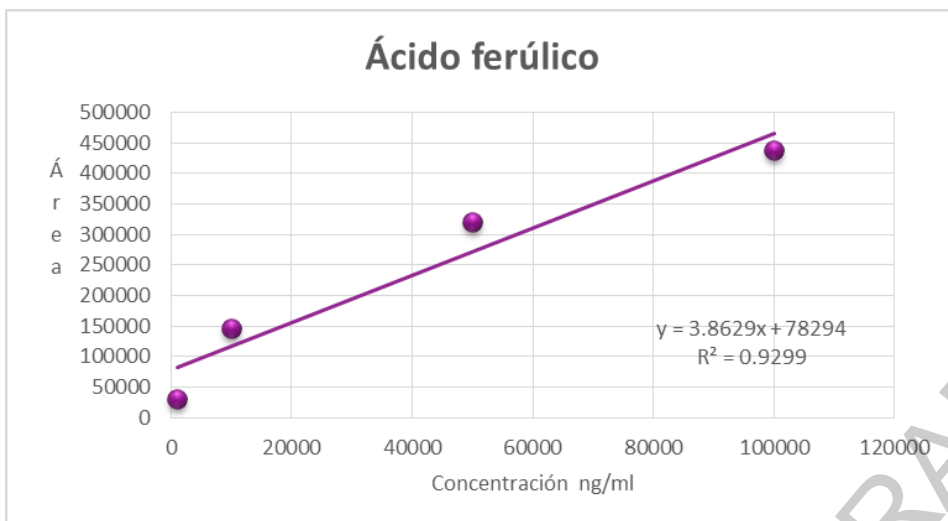


Figura 9. Curva de calibración del ácido ferúlico

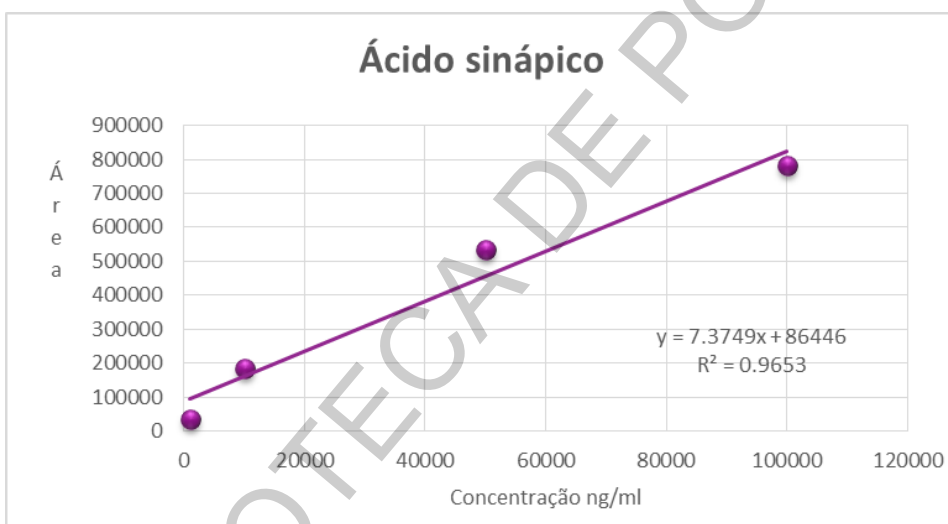


Figura 10. Curva de calibración del ácido sinápico

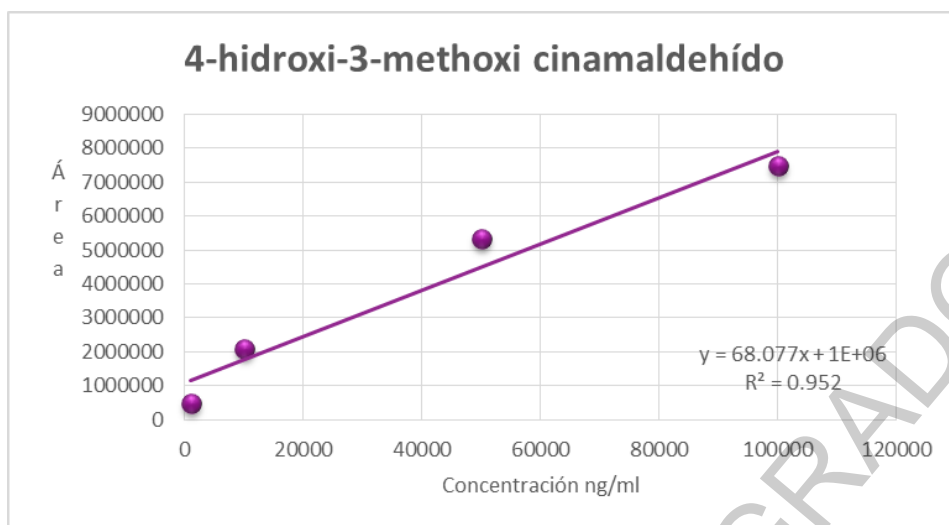


Figura 11. Curva de calibración de 4 hidroxi-3-metoxi cinnamaldehído

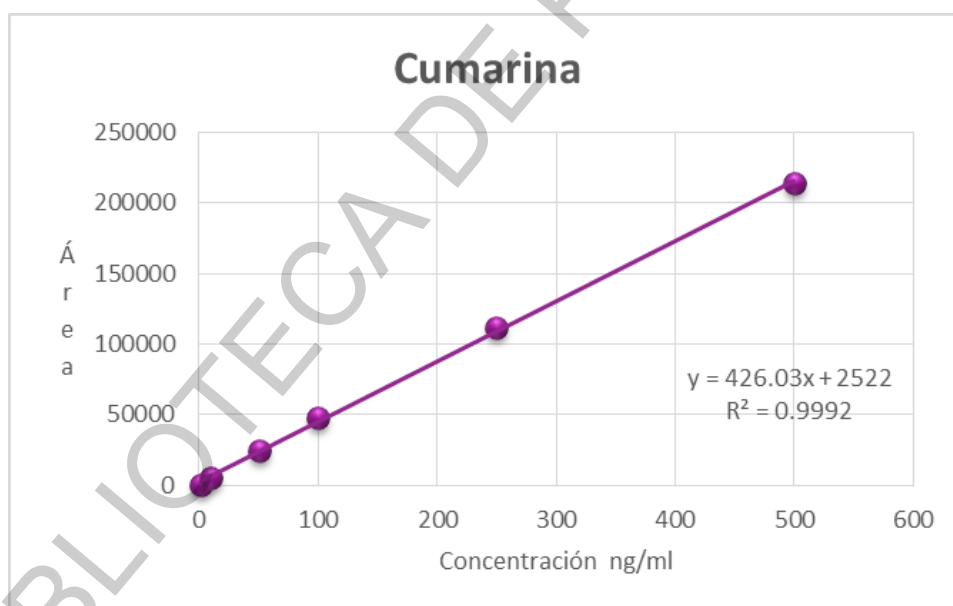


Figura 12. Curva de calibración de cumarina

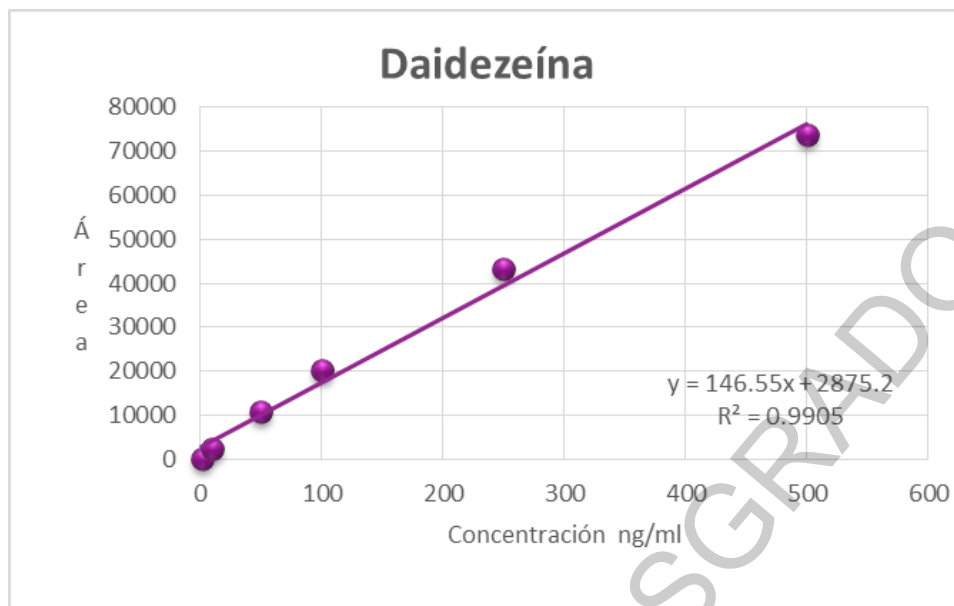


Figura 13. Curva de calibración de daidezeína

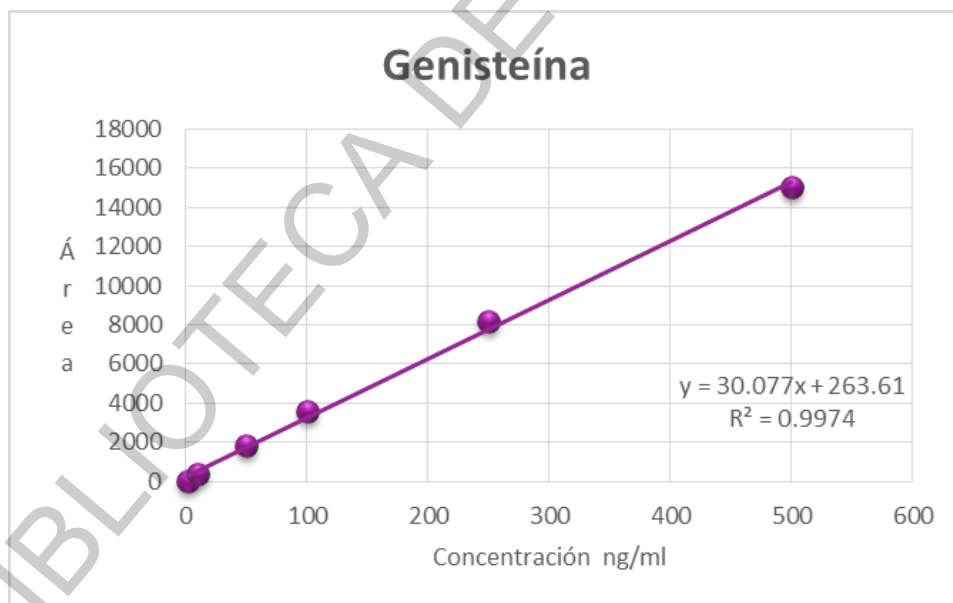


Figura 14. Curva de calibración de genisteína

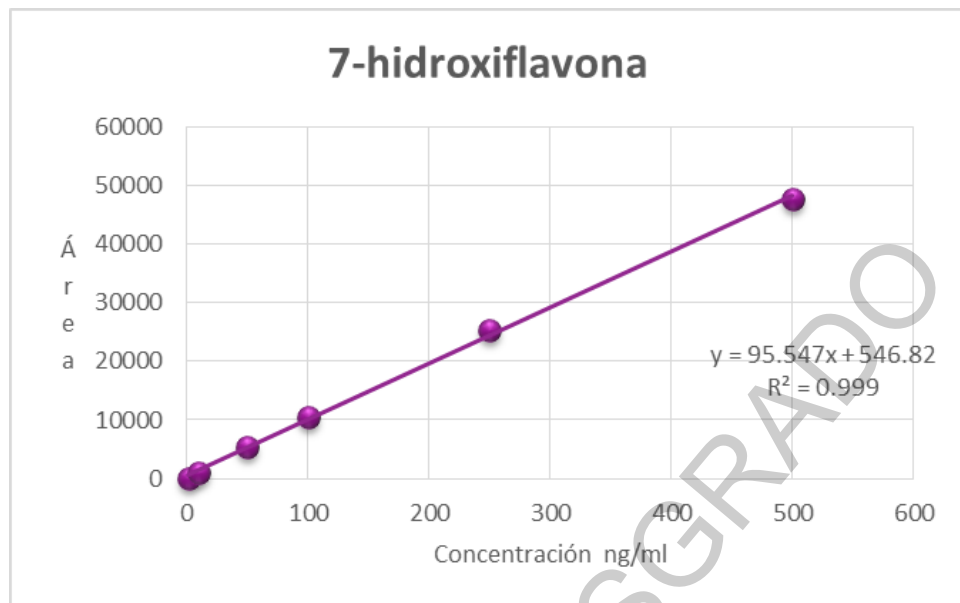


Figura 15. Curva de calibración de 7- hidroxi flavona

BIBLIOTECA DE POSGRADO

ANEXO II

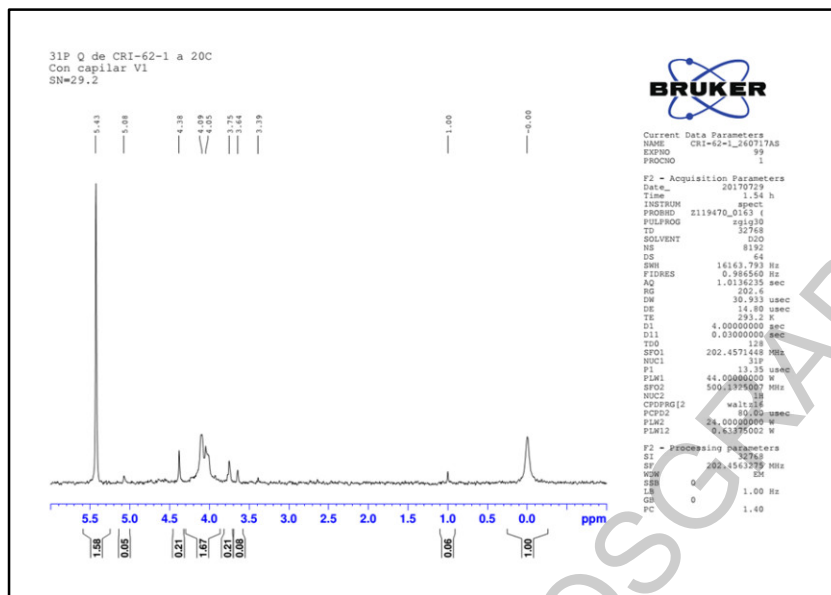


Figura 16. Espectro ^{31}P NMR de pulpa de papa nativa Huagalina.

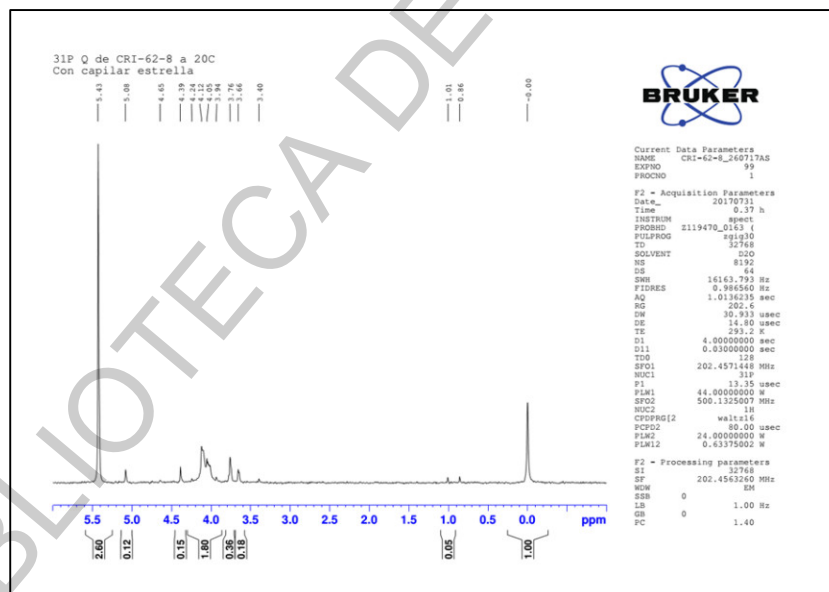


Figura 17. Espectro ^{31}P NMR de cáscara de papa nativa Huagalina.

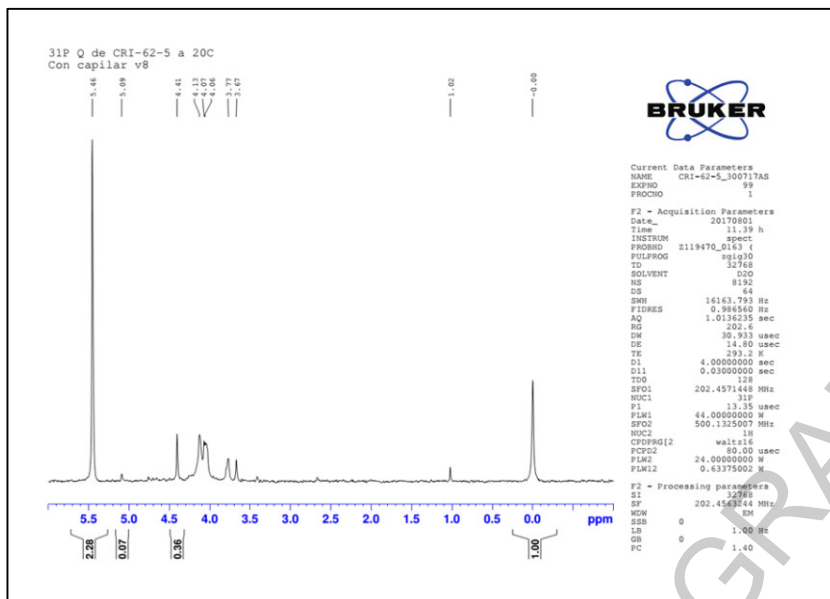


Figura 18. Espectro ^{31}P NMR de pulpa de papa comercial Canchan

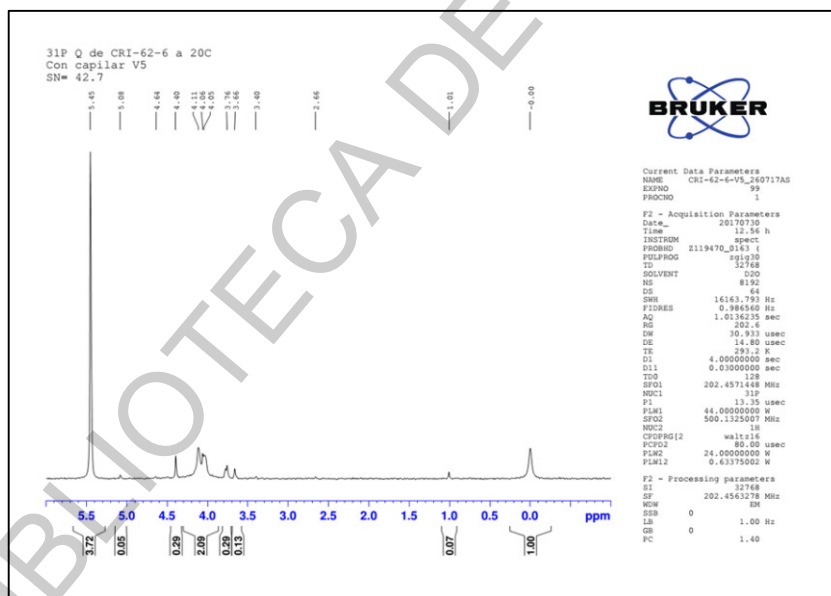


Figura 19. Espectro ^{31}P NMR de cáscara de papa comercial Canchan