

Universidad Técnica Federico Santa María

Universidad de Valparaíso

Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias,
mención Química

Desarrollo de estrategias analíticas para la determinación
de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales
en diferentes variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*)

Bianca Guzmán Condarco

Valparaíso, Chile

2026



Universidad Técnica Federico Santa María

Universidad de Valparaíso

Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias, mención
Química

Desarrollo de estrategias analíticas para la determinación de
compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en diferentes
variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*)

Tesis de grado presentada por
Bianca Guzmán Condarco

Como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en Ciencias, Mención Química

Directora de tesis
Profa. PhD Catherine V. Tessini Ortiz

Valparaíso, Chile

2026

Universidad Técnica Federico Santa María

Universidad de Valparaíso

Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias, mención
Química

Título de la tesis:

Desarrollo de estrategias analíticas para la determinación de
compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en diferentes
variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*)

Autor:

Bianca Guzmán Condarco

Trabajo de tesis, presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para el
Grado de Doctor en Ciencias, mención Química de la Universidad Técnica
Federico Santa María y de la Universidad de Valparaíso.

Profa. PhD María Gabriela Lobos

Prof. PhD Edwar Fuentes (UCH)

Prof. PhD Franz Thomet (USM)

Prof. PhD Fermin Valenzuela (USM)

Valparaíso, Chile 2026

Dedicación del trabajo

A mis padres, Hernán Guzmán y Uvaldina Condarco, por su amor incondicional, su sacrificio incansable y su esfuerzo constante para brindarme mejores oportunidades, aun frente a las dificultades y adversidades de la vida.

A mis queridos hermanos y hermanas que siempre me apoyaron e impulsaron cuando más lo necesitaba.

Agradecimientos

A Dios, mi mayor fuente de fortaleza, guía espiritual, esperanza e inspiración, expreso mi gratitud más profunda, sin Él nada de lo que tengo en esta vida habría sido posible.

La presente investigación fue desarrollada en los Laboratorios de Química Analítica Instrumental del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, bajo la dirección de la Profa. Dra. Catherine Tessini Ortiz y la supervisión de la Profa. Ing. Beatriz Vivanco Retamal. A ambas deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su valioso aporte científico, su orientación académica y, especialmente, por el apoyo humano y personal que me brindaron a lo largo de esta etapa doctoral.

Asimismo, agradezco al Dr. Luis Espinoza y al Dr. Rodrigo Segura por haberme aceptado en el Programa Doctoral Conjunto en Ciencias, Mención Química. Su respaldo y confianza marcaron significativamente mi trayectoria académica, por lo que siempre les estaré profundamente agradecida. Extiendo también mi agradecimiento a la Universidad Técnica Federico Santa María y la Universidad de Valparaíso, así como al Programa Doctoral en Ciencias, Mención Química, por el apoyo financiero otorgado a través de la beca de estudios, la cual hizo posible la continuidad de mi formación doctoral en Chile. De manera especial, agradezco a la Dra. Gabriela Lobos y a los integrantes del comité académico del programa por su constante apoyo, orientación y colaboración durante todo este proceso.

A mi familia, a mi padre, Hernán Guzmán, a mi madre, Uvaldina Condarco, quien vive eternamente en mi corazón, y a mis hermanos Hernán, Eduar, Rocío, Edilver, Yhoselin y Emerzon, gracias por su amor incondicional, por acompañarme en cada desafío y por creer en mí incluso en los momentos más difíciles. Ustedes han sido el pilar fundamental sobre el que he construido cada uno de mis logros. Este sueño también les pertenece.

A mi esposo, Mauricio Encinas, quiero dedicar un agradecimiento especial lleno de amor y gratitud. Gracias por tu compañía incondicional, por tu paciencia infinita, por tu apoyo académico y emocional desde el primer día en que nuestras vidas se cruzaron. Gracias por caminar a mi lado en cada etapa de este proceso, por celebrar mis logros como propios y por sostenerme en los momentos de incertidumbre. Pero, sobre todo, gracias por la hermosa familia que hemos construido juntos y por nuestro pequeño Mauricito que viene en camino, quien llena nuestros corazones de ilusión y alegría.

También deseo agradecer infinitamente a las profesoras Beatriz Vivanco, María Elena Ortiz e Isabel Jiménez, así como a Don Nelson, por su constante apoyo, cariño y generosidad desde mi llegada a la universidad. Más allá de lo académico, me hicieron sentir acogida y acompañada, convirtiéndose en una familia muy especial durante estos años.

Finalmente, agradezco de corazón a mis amigos hermanos, quienes estuvieron presentes a lo largo de este camino y compartieron conmigo alegrías, desafíos y aprendizajes. En especial a Dioni Arriechi, María Núñez, Angélica Durán, Katherin Villalón y María Belén. A todas las personas del Departamento de Química (USM) que, de una u otra manera, contribuyeron a la realización de esta tesis y a mi formación como investigadora y como persona, mi más sincero agradecimiento.

Resumen

Desarrollo de estrategias analíticas para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en diferentes variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*)

Palabras Claves: *Ullucus tuberosus*, alimentos andinos, compuestos fenólicos, antioxidantes, carbohidratos no estructurales, azúcares solubles, extracción asistida con ultrasonido, técnicas cromatográficas, métodos espectrofotométricos, UHPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ELSD.

El ulluco (*Ullucus tuberosus*) es un tubérculo andino de alto valor nutricional y cultural que constituye una fuente potencial de compuestos bioactivos y metabolitos de interés alimentario. Sin embargo, la información disponible sobre su composición química es limitada, particularmente en relación con la diversidad fenotípica y con la aplicación de metodologías analíticas que permitan una caracterización integral de su composición química. En este contexto, el objetivo de esta tesis fue desarrollar estrategias analíticas para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en cinco variedades de ulluco con diferente coloración.

La investigación combinó la extracción asistida con ultrasonido (EAU), métodos espectrofotométricos UV/Vis y metodologías cromatográficas acopladas a diferentes sistemas de detección, incluyendo UHPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ELSD y GC-MS. La integración de estas técnicas analíticas instrumentales permitió obtener información tanto global como específica, favoreciendo una caracterización cualitativa y cuantitativa, particularmente de los perfiles fenólicos y carbohidratos solubles presentes en las variedades de este tubérculo.

Para el análisis de compuestos fenólicos, se determinaron el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA) mediante los ensayos Folin-Ciocalteu y FRAP, respectivamente, mientras que la caracterización de compuestos fenólicos individuales se realizó mediante UHPLC-ESI-MS/MS. La metodología permitió identificar y comparar compuestos pertenecientes principalmente a las familias de los ácidos fenólicos y flavonoides, siendo este último el grupo predominante. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre variedades ($p < 0.05$) para el CFT, la AA y los flavonoides individuales. La variedad amarilla presentó los menores valores de CFT y AA, mientras que las variedades con mayor intensidad de pigmentación mostraron concentraciones significativamente superiores, sugiriendo una asociación entre la composición fenólica y las características varietales del tubérculo.

Para la determinación de carbohidratos no estructurales, las condiciones de extracción asistida por ultrasonido fueron optimizadas mediante metodología de superficie de respuesta (RSM) utilizando un diseño Box-Behnken. Se evaluó el efecto de la composición del solvente, el tiempo y la temperatura de extracción sobre la recuperación de carbohidratos solubles. Los carbohidratos solubles totales (CST) y los azúcares reductores (AR) fueron cuantificados mediante los métodos fenol-sulfúrico y DNSA, respectivamente. La identificación de azúcares solubles se realizó por GC/MS y la cuantificación mediante HPLC-ELSD. Los contenidos de CST variaron entre 27 y 39 g equivalentes de glucosa/100 g de peso seco, mientras que los AR oscilaron

entre 15.8 y 24.0 g equivalentes de glucosa/100 g de peso seco. La glucosa y la fructosa fueron los azúcares predominantes en todas las variedades analizadas, seguidas por la sacarosa, observándose diferencias estadísticamente significativas entre variedades.

Desde la perspectiva de la Química Analítica, uno de los principales aportes de esta investigación fue la integración de estrategias de extracción optimizadas con metodologías espectrofotométricas y técnicas cromatográficas de alta selectividad validadas para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos solubles en una matriz vegetal compleja. Este enfoque permitió generar información analítica selectiva, precisa y confiable sobre la composición química del ulluco.

En conjunto, los resultados evidenciaron una marcada variabilidad en el contenido de compuestos fenólicos y carbohidratos solubles entre las variedades analizadas. Asimismo, este trabajo constituye uno de los primeros estudios que integran metodologías analíticas complementarias para la caracterización simultánea de ambos grupos de compuestos en ulluco, aportando información novedosa sobre su composición química y estableciendo bases científicas para su valorización como alimento funcional.

Abstract

Development of analytical strategies for the determination of phenolic compounds and non-structural carbohydrates in different ulluco (*Ullucus tuberosus*) varieties.

Keyword: *Ullucus tuberosus*, Andean tubers, phenolic compound, antioxidants, non-structural carbohydrates, soluble sugars, ultrasonic-assisted extraction, spectrophotometric methods, chromatographic methods, UHPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ELSD.

Ulluco (*Ullucus tuberosus*) is an Andean tuber of high nutritional and cultural value that represents a potential source of bioactive compounds and food-relevant metabolites. However, information regarding its chemical composition remains limited, particularly with respect to the phenotypic diversity and the application of analytical methodologies that enable a comprehensive characterization of its chemical profile. In this context, the aim of this thesis was to develop analytical strategies for the determination of phenolic compounds and non-structural carbohydrates in five ulluco varieties with different pigmentation patterns.

The study combined ultrasound-assisted extraction (UAE), UV/Vis spectrophotometric methods, and chromatographic techniques coupled with different detection systems, including UHPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ELSD, and GC-MS. The integration of these instrumental analytical techniques provided both global and compound-specific information, enabling a comprehensive qualitative and quantitative characterization of the phenolic profiles and soluble carbohydrates present in the studied ulluco varieties.

For phenolic compound analysis, total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (AA) were determined using the Folin–Ciocalteu and FRAP assays, respectively, while the characterization of individual phenolic compounds was performed by UHPLC-ESI-MS/MS. This analytical approach enabled the identification and comparison of compounds belonging mainly to the phenolic acid and flavonoid classes, with flavonoids being the predominant group. Statistical analysis revealed significant differences among varieties ($p < 0.05$) in TPC, AA, and individual flavonoids. The yellow variety exhibited the lowest TPC and AA values, whereas varieties with more intense pigmentation showed significantly higher concentrations, suggesting an association between phenolic composition and varietal characteristics of the tuber.

For the determination of non-structural carbohydrates, ultrasound-assisted extraction conditions were optimized using response surface methodology (RSM) based on a Box–Behnken design. The effects of solvent composition, extraction time, and extraction temperature on soluble carbohydrate recovery were evaluated. Total soluble carbohydrates (TSC) and reducing sugars (RS) were quantified using the phenol–sulfuric acid and DNSA methods, respectively. Soluble sugars were identified by GC-MS and quantified by HPLC-ELSD. TSC contents ranged from 27 to 39 g glucose equivalents per 100 g dry weight (DW), whereas RS contents varied from 15.8 to 24.0 g glucose equivalents per 100 g DW. Glucose and fructose were the predominant sugars in all varieties, followed by sucrose, with statistically significant differences observed among varieties.

From an Analytical Chemistry perspective, one of the main contributions of this research was the integration of optimized extraction strategies with validated spectrophotometric methodologies and highly selective chromatographic techniques for the determination of phenolic compounds and soluble carbohydrates in a complex plant matrix. This approach generated selective, accurate, and reliable analytical information regarding the chemical composition of ulluco.

Overall, the results revealed marked variability in the contents of phenolic compounds and soluble carbohydrates among the varieties studied. Furthermore, this work represents one of the first studies to integrate complementary analytical methodologies for the simultaneous characterization of both classes of compounds in ulluco, providing novel insights into its chemical composition and establishing a scientific basis for its valorization as a functional food.

Índice

1. Capítulo: Introducción.....	1
1.1. Introducción general	1
1.2. Características generales del <i>Ullucus tuberosus</i>	1
1.3. Características nutricionales generales del ulluco	2
1.4. Fitoquímicos en ulluco.....	2
1.5. Uso tradicional.....	3
1.6. Ulluco como matriz de interés analítico.....	3
2. Capítulo: Marco teórico y fundamentos analíticos	5
2.1. Ulluco como matriz vegetal compleja.....	5
2.2. Análisis proximal y composición mineral.....	6
2.3. Compuestos fenólicos: Fundamentos químicos y desafíos analíticos	6
2.3.1. Definición y clasificación de los compuestos fenólicos.....	6
2.3.2. Ácidos fenólicos y flavonoides.....	8
2.3.3. Estabilidad y reactividad	10
2.3.4. Desafíos analíticos en la determinación de compuestos fenólicos	11
2.4. Carbohidratos no estructurales: Fundamentos químicos y analíticos	11
2.4.1. Definición y clasificación	11
2.4.2. Carbohidratos no estructurales.....	12
2.4.3. Desafíos analíticos en la determinación de carbohidratos no estructurales	13
2.5. Preparación de la muestra.....	14
2.5.1. Extracción asistida con ultrasonido (EAU).....	15
2.5.2. Extracción en fase sólida (SPE).....	16
2.6. Técnicas instrumentales y métodos de detección	16
2.6.1. Espectrofotometría UV/Vis.....	17
2.6.2. UHPLC-ESI-MS/MS.....	20
2.6.3. HPLC-ELSD	21
2.6.4. GC/MS	21
3. Capítulo: Antecedentes científicos y analíticos.....	23
3.1. Antecedentes sobre composición proximal y mineral del ulluco	23
3.2. Antecedentes de compuestos fenólicos y actividad antioxidante	25
3.3. Antecedentes sobre carbohidratos no estructurales y azúcares solubles	27

4. Capítulo: Planteamiento del problema.....	29
4.1. Hipótesis.....	31
4.2. Objetivo general.....	31
4.2.1. Objetivos específicos.....	31
5. Capítulo: Metodología.....	32
5.1. Diseño general del estudio.....	32
5.2. Muestras y tratamiento de muestra.....	32
5.3. Análisis proximal.....	33
5.4. Determinación de compuestos fenólicos.....	33
5.4.1. Reactivos y soluciones estándar.....	33
5.4.2. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	34
5.4.3. Métodos espectrofotométricos UV/Vis: Folin-Cicalteu y FRAP.....	34
5.4.4. UHPLC-ESI-MS/MS.....	35
5.5. Determinación de carbohidratos no estructurales.....	38
5.5.1. Reactivos y soluciones estándar.....	38
5.5.2. Extracción asistida por ultrasonido para carbohidratos.....	38
5.5.3. Optimización mediante el diseño Box-Behnken.....	39
5.5.4. Métodos espectrofotométricos UV/Vis para carbohidratos solubles.....	39
5.5.5. HPLC-ELSD.....	40
5.5.6. Identificación de carbohidratos por GC/MS.....	41
5.6. Análisis estadístico.....	41
6. Capítulo: Resultados y Discusión.....	43
6.1. Objetivo específico 1: Análisis proximal de cinco variedades de ulluco.....	43
6.2. Objetivo específico 2: Determinación espectrofotométrica del contenido fenólico total y de la actividad antioxidante.....	44
6.2.1. Concentración de etanol.....	44
6.2.2. Temperatura de extracción.....	45
6.2.3. Tiempo de sonicación.....	46
6.2.4. Validación del método Folin-Cicalteu y FRAP.....	46
6.2.5. Resultados del contenido fenólico total y la actividad antioxidante en las cinco variedades de ulluco.....	48
6.3. Objetivo específico 3: Determinación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS	
49	
6.3.1. Separación simultánea de 13 compuestos fenólicos.....	49

6.3.2.	Condiciones SRM (<i>Selected Reaction Monitoring</i>).....	51
6.3.3.	Parámetros analíticos del método cromatográfico UHPLC-ESI-MS/MS.....	53
6.3.4.	Extracción en fase sólida SPE-C8.....	54
6.3.5.	Determinación de compuestos fenólicos en cinco variedades de ulluco	55
6.3.6.	Correlación estadística y análisis de componentes principales (PCA)	58
6.4.	Objetivo específico 4: Determinación espectrofotométrica de carbohidratos totales y azúcares reductores.	62
6.4.1.	Parámetros analíticos del método fenol-sulfúrico y DNSA	62
6.4.2.	Optimización de la extracción mediante el diseño Box-Behnken	67
6.4.3.	Resultados de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores en cinco variedades de ulluco.....	70
6.5.	Objetivo específico 5: Identificación de azúcares por GC/MS y cuantificación por HPLC-ELSD.....	71
6.5.1.	Identificación de azúcares por GC/MS.....	71
6.5.2.	Optimización de las condiciones cromatográficas HPLC-ELSD	74
6.5.3.	Parámetros analíticos del método cromatográfico	75
6.5.4.	Resultados de cuantificación de carbohidratos por HPLC-ELSD	77
7.	Capítulo: Conclusiones	79
8.	Referencias.....	81
9.	Anexos	94

Índice de figuras

Figura 1.1 Variedades de ulluco (<i>Ullucus tuberosus</i>) cultivadas en la región andina.	2
Figura 2.1 Representación gráfica de la planta de ulluco (<i>Ullucus tuberosus</i>).	5
Figura 2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos según su estructura química.	7
Figura 2.3 Estructuras representativas de los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos.	8
Figura 2.4 Estructura general y clasificación de los flavonoides.....	9
Figura 2.5 Clasificación de los carbohidratos según su función y distribución en la planta.	12
Figura 2.6 Estructuras químicas de algunos azúcares simples.	13
Figura 2.7 Generación de microburbujas en la extracción asistida por ultrasonido (EAU).	15
Figura 2.8 Reacción general colorimétrica del método Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico total mediante espectrofotometría UV/Vis.	17
Figura 2.9 Mecanismo de reacción del poder antioxidante reductor férrico (FRAP): ArOH representa el antioxidante y [ArOH] ⁺ representa un antioxidante oxidado [52]	18
Figura 2.10 Reacción general colorimétrica del método fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos solubles totales.....	19
Figura 2.11 Reacción colorimétrica DNSA para la determinación de azúcares reductores.	20
Figura 4.1 Estrategia analítica general para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i>	30
Figura 5.1 Variedades de <i>Ullucus tuberosus</i> obtenidas del mercado local de Chile.....	32
Figura 5.2 Estructuras químicas de 13 compuestos fenólicos investigados en cinco variedades de ulluco por UHPLC-ESI-MS/MS.	36
Figura 6.1 Experimento unifactorial para la extracción asistida por ultrasonido (EAU): (a) Efecto de la concentración de etanol, (b) temperatura de extracción, y (c) tiempo de extracción sobre el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA) en el ulluco morado (U-1). Letras diferentes dentro del mismo grupo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los promedios, según lo determinado por la prueba de rangos múltiples de Duncan.....	45
Figura 6.2 Espectro de absorción UV/Vis (400-800 nm) y curvas de calibración de los métodos espectrofotométricos: (a, b) Contenido fenólico total (CFT) usando el método Folin-Ciocalteu y (c, d) actividad antioxidante usando el método FRAP.	46
Figura 6.3 Separación simultánea de trece compuestos fenólicos mediante UHPLC-ESI-MS/MS en modo full scan, utilizando una columna Hypersil Gold™ C18 (1.9 μm , 50 mm x 2.1 mm d.i.).	

a) Cromatograma de iones totales (Total ion chromatogram, TIC). b - e) UV/Vis a 210, 280, 320 y 360 nm. (1) ácido gálico, (2) ácido 4-hidroxibenzoico, (3) ácido clorogénico, (4) ácido cafeico, (5) (-)-epicatequina, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido ferúlico, (8) rutina, (9) quercetina-3-glucósido, (10) kaempferol-3-rutinósido, (11) isorhamnetina-3-rutinósido, (12) quercetina y (13) kaempferol...50

Figura 6.4 Cromatograma de iones totales (Total ion chromatograms, TICs) obtenido mediante el sistema UHPLC-ESI-MS/MS para cinco variedades de *Ullucus tuberosus*: (a) morado (U-1), (b) morado-naranja (U-2), (c) naranja-amarillo (U-3), (d) amarillo (U-4), y (e) amarillo-verde (U-5); Señales: 8. Rutina, 9. Quercetina-3-glucósido, 10. Kaempferol-3-rutinósido, 11. Isorhamnetina-3-rutinósido. 56

Figura 6.5 (a) Correlación estadística de Pearson ($p < 0.05$) entre CFT, FRAP, rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido, e isorhamnetina-3-rutinósido de las variedades de *Ullucus tuberosus*; (*): Estadísticamente significativo; (b) muestra una correlación positiva entre CFT y FRAP; (c) muestra una correlación cercana a cero entre la rutina y la quercetina-3-glucósido, y (d) muestra una anticorrelación entre FRAP e isorhamnetina-3-rutinósido. 59

Figura 6.6 Análisis de componentes principales (PCA, Principal Component Analysis) de las variedades de ulluco: (a) Gráfico de sedimentación que muestra el porcentaje de varianza explicado para cada componente principal, (b) Gráfico de contribución de las variable para cada componente, (c) Biplot del PCA que muestra la distribución de las variedades de ulluco y la contribución de las variables analizadas. 60

Figura 6.7 Representación esquemática de las propiedades farmacológicas reportadas en la literatura científica para la rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido. 61

Figura 6.8 Espectro de absorción UV/Vis medido entre 400 y 800 nm y rangos lineales de los métodos espectrofotométricos: a y b, espectro UV/VIS y rango lineal para el método fenol-sulfúrico; c y d, espectro UV/Vis y rango lineal para azúcares reductores. 62

Figura 6.9 Estabilidad de las curvas de calibración en el intervalo de tiempo de 1 a 72 horas para los métodos espectrofotométricos: a) fenol-sulfúrico y b) DNSA.....65

Figura 6.10 Espectros UV-Vis de los extractos de ulluco morado (U-1) y amarillo (U-4) tratados y no tratados con reactivo de Carrez para la determinación de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores. 66

Figura 6.11 Método de Superficie Respuesta Box-Behnken y gráficos de contorno para la extracción de carbohidratos totales solubles mediante extracción asistida con ultrasonido. 68

Figura 6.12 Cromatograma de iones de totales (TIC, Total Ion Chromatogram) del extracto de ulluco morado (U-1) analizado por GC/MS: Principales azúcares identificados, glucosa, fructosa y sacarosa.....	72
Figura 6.13 Cromatogramas representativos de azúcares usando HPLC-ELSD: a) Separación simultánea de una mezcla de estándares de ramnosa, xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa y sacarosa; b) Cromatograma representativo de azúcares presentes en la muestra de ulluco amarillo (U-4).....	74
Figura 9.1 Cromatogramas de extractos de ulluco morado (U-1) por UHPLC-ESI-MS/MS: a) Cromatograma de iones totales con y sin SPE-C8, b) Cromatogramas UV/Vis a 280 nm con y sin SPE-C8, b) Cromatogramas UV/Vis a 280 nm con y sin SPE-C8.....	94
Figura 9.2 Cromatograma UV/Vis a 280 nm de cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i> usando UHPLC-ESI-MS/MS: (a) Morado (U-1), (b) Morado-naranja (U-2), (c) Naranja-amarillo (U-3), (d) Amarillo (U-4), y (e) Amarillo-verde (U-5). 8. Rutina, 9. Quercetina-3-glucósido, 10. Kaempferol-3-rutinósido, 11. Isorhamnetina-3-rutinósido.....	95
Figura 9.3 Cromatogramas del extracto de ulluco morado (U-1) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.....	96
Figura 9.4 Cromatogramas del extracto de ulluco morado-naranja (U-2) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.	97
Figura 9.5 Cromatogramas del extracto de ulluco naranja-amarillo (U-3) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.	98
Figura 9.6 Cromatogramas del extracto de ulluco amarillo (U-4) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.....	99
Figura 9.7 Cromatogramas del extracto de ulluco amarillo-verde (U-5) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.	100

Índice de tablas

Tabla 3.1 Composición proximal del <i>Ullucus tuberosus</i> reportada en la literatura.....	23
Tabla 3.2 Composición mineral del <i>Ullucus tuberosus</i> reportada en la literatura.....	24
Tabla 3.3 Técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de compuestos fenólicos en <i>Ullucus tuberosus</i>	26
Tabla 3.4 Técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de carbohidratos no estructurales en <i>Ullucus tuberosus</i>	27
Tabla 5.1 Descripción de las muestras de <i>Ullucus tuberosus</i> analizadas.	33
Tabla 6.1 Análisis proximal de cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i>	43
Tabla 6.2 Parámetros analíticos de los métodos espectrofotométricos para la determinación del contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA) en ulluco.	47
Tabla 6.3 Contenido fenólico total (CFT) y actividad antioxidante (AA) de cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i>	48
Tabla 6.4 Condiciones de análisis para la determinación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM.	52
Tabla 6.5 Parámetros analíticos del método cromatográfico UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM.	54
Tabla 6.6 Precisión y recuperación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM en ulluco morado (U-1).	55
Tabla 6.7 El contenido (µg/g) de trece compuestos fenólicos investigados en cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i> mediante UHPLC-ESI-MS/MS.....	57
Tabla 6.8 Parámetros analíticos del método espectrofotométrico fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos solubles totales.	63
Tabla 6.9 Parámetros analíticos del método espectrofotométrico DNSA para la determinación de azúcares reductores.	64
Tabla 6.10 Extractos de ulluco morado (U-1) y amarillo (U-4) tratados y no tratados con reactivo de Carrez para la determinación de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores.	66
Tabla 6.11 Análisis de varianza del diseño experimental Box-Behnken.	69
Tabla 6.12 Contenido de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores en las cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i>	70
Tabla 6.13 Identificación de azúcares por GC/MS en cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i>	73

Tabla 6.14 Parámetros analíticos del método cromatográfico HPLC-ELSD para la determinación de azúcares.	76
Tabla 6.15 % de recuperación de seis azúcares para el método cromatográfico HPLC-ELSD en la muestra de ulluco amarillo (U-4).	76
Tabla 6.16 Azúcares solubles determinados por HPLC-ELSD en cinco variedades de <i>Ullucus tuberosus</i>	77
Tabla 9.1 Valores- <i>p</i> de la correlación estadística de Pearson	101
Tabla 9.2 Diseño de experimento Box-Behnken para la extracción de carbohidratos solubles totales usando extracción asistida con ultrasonido.....	101

Abreviaturas

• AA	:	Actividad Antioxidante
• CFT	:	Contenido Fenólico Total
• DAD	:	Diodo Array Detector
• DW	:	Dry Weight
• FW	:	Fresh Weight
• EAU	:	Extracción asistida con ultrasonido
• EAG	:	Equivalentes de Ácido Gálico
• ET	:	Equivalentes de Trolox
• FRAP	:	Ferric Reducing Antioxidant
• GC	:	Gas Chromatographic
• H-ESI	:	High-Electro Spray Ionization
• LOD	:	Limit of Detection
• LOQ	:	Limit of Quantification
• MS	:	Mass Spectrometry
• PCA	:	Principal Component Analysis
• RSD	:	Relative Standard Deviation
• s	:	Desviación estándar
• SPE	:	Solid-Phase Extraction
• UHPLC	:	Ultra-High-performance liquid chromatography

1. Capítulo: Introducción

1.1. Introducción general

En los últimos años, la caracterización química de matrices alimentarias de origen vegetal ha adquirido un interés creciente debido a su aporte nutricional y a la presencia de metabolitos primarios y secundarios asociados a propiedades funcionales. Entre estos compuestos se incluyen polifenoles, pigmentos naturales, carbohidratos, aminoácidos, minerales y otros fitoconstituyentes, cuya concentración y distribución pueden variar según la especie, variedad, origen geográfico, condiciones de cultivo y procesamiento postcosecha [1–5]. En este contexto, resulta relevante desarrollar estrategias analíticas que permitan determinar estos componentes de manera confiable, especialmente en matrices vegetales poco estudiadas o subutilizadas.

La región andina de América del Sur constituye uno de los principales centros de domesticación y biodiversidad agrícola, destacándose por la producción de tubérculos tradicionales con alto valor nutricional [6,7]. Además de cultivos ampliamente estudiados, como la papa (*Solanum tuberosum*), existen otros tubérculos andinos subutilizados, entre ellos la oca (*Oxalis tuberosa*), el isaño (*Tropaeolum tuberosum*), el yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y el ulluco (*Ullucus tuberosus*). Estos cultivos forman parte de la alimentación tradicional andina y contienen compuestos de interés nutricional y fitoquímico; sin embargo, la información científica disponible sobre su composición química y caracterización analítica sigue siendo limitada.

Entre estos tubérculos, el ulluco destaca por su diversidad fenotípica, composición nutricional y potencial como matriz alimentaria de origen andino. Por ello, su estudio requiere no solo describir su composición general, sino también desarrollar estrategias analíticas que permitan determinar compuestos de interés, tales como compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales, considerando la complejidad propia de esta matriz vegetal.

1.2. Características generales del *Ullucus tuberosus*

El ulluco (*Ullucus tuberosus*) se cultiva desde el sur de Venezuela hasta el norte de Chile y Argentina en elevaciones entre 2400 y 4200 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.); sin embargo, la mayor producción se obtiene entre 3600 y 3800 m.s.n.m. [8,9].

El tamaño de los tubérculos varía entre 2 y 10 cm, y pueden adquirir diferentes formas (como cilíndricos, ovalados, falcados, fusiformes, apicales y fusiformes en ambos extremos) [10]. También exhibe diferentes colores (blanco, amarillo, anaranjado, morado, rojizo y mezclas de estos colores) que pueden variar en intensidad [11]. En la **Figura 1.1** se muestran algunas de las variedades de tubérculos de ulluco cultivadas en la región andina. La piel o cáscara es muy delgada y no requiere pelarse para su consumo; además, el centro del tubérculo es mucilaginoso y con alto contenido de agua.

El cultivo, aunque es resistente a las heladas, se desarrolla bien a temperaturas entre 8 y 14 °C en suelos sueltos, arenosos o francos y con alto contenido de materia orgánica [10]. Su alto valor nutricional, junto con su capacidad de adaptación agroambiental, ha permitido la

reintroducción de este cultivo en Nueva Zelanda, lo que ha favorecido su producción y comercialización fuera de la región andina [12].



Figura 1.1 Variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*) cultivadas en la región andina.

1.3. Características nutricionales generales del ulluco

De acuerdo con antecedentes reportados en la literatura, los tubérculos de ulluco se caracterizan por presentar un alto contenido de humedad (81% a 86%), carbohidratos (73.5% a 83%) y proteína (4.2% a 15.7%), y en menor proporción lípidos (0.1% a 1.4%) y fibra cruda (3.6% - 14.0%) [7,12]. Su composición mineral incluye potasio, sodio, cobre, hierro, calcio, magnesio, zinc, manganeso, fósforo y selenio, siendo el potasio el mineral más abundante [7,13]. Además, se ha reportado la presencia de aminoácidos esenciales, como la histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina+cisteína, fenilalanina+tirosina, triptófano y valina, lo que incrementa su interés nutricional.

1.4. Fitoquímicos en ulluco

Por otro lado, además de su aporte nutricional, el *Ullucus tuberosus* contiene una amplia diversidad de fitoquímicos derivados del metabolismo secundario de las plantas, los cuales cumplen funciones ecológicas relacionadas con mecanismos de defensa frente a factores bióticos y abióticos. Asimismo, diversos fitoquímicos presentes en matrices vegetales han sido asociados con propiedades funcionales, lo que ha incrementado el interés en su determinación, caracterización estructural y cuantificación mediante técnicas analíticas de alta selectividad y sensibilidad.

La composición fitoquímica del ulluco incluye metabolitos de distinta polaridad, estabilidad química y peso molecular, entre los que destacan compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, aminoácidos, saponinas, carbohidratos y pigmentos betalaínicos, como las betacianinas y betaxantinas [13–21]. Todos estos compuestos participan en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del tubérculo, influyendo en parámetros como color, capacidad antioxidante, perfil sensorial y estabilidad química. En particular, las betalainas son responsables de la coloración de los tubérculos, los compuestos fenólicos están asociados a las características sensoriales y a la actividad antioxidante, y los carbohidratos son fundamentales para la reserva energética y composición química del tubérculo.

La diversidad estructural, distribución y concentración de estos fitoquímicos pueden variar significativamente según la variedad, origen geográfico, condiciones agroambientales, procesos postcosecha [1,3,4]. Además, la presencia de fitoquímicos en el ulluco puede estar asociada a su uso en la medicina tradicional andina.

1.5. Uso tradicional

Además de su uso alimentario, el ulluco ha sido empleado tradicionalmente en las comunidades andinas en distintos contextos etnobotánicos [22]. Estos antecedentes etnobotánicos refuerzan el interés por estudiar su composición química; sin embargo, la presente tesis no aborda la evaluación farmacológica del tubérculo, sino el desarrollo de estrategias analíticas para determinar compuestos de interés nutricional y fitoquímico.

1.6. Ulluco como matriz de interés analítico

El *Ullucus tuberosus* constituye una matriz de interés analítico debido a la complejidad y la heterogeneidad de su composición química. Este tubérculo se caracteriza por presentar un alto contenido de humedad, minerales, carbohidratos, proteínas, pigmentos hidrosolubles y metabolitos secundarios, cuyos niveles de concentración, estabilidad y distribución pueden variar entre variedades [7,13,17]. Esta variabilidad composicional puede influir en sus características fenotípicas, nutricionales y funcionales, así como en el comportamiento de los analitos durante las etapas de preparación y análisis de la muestra.

Desde una perspectiva analítica, el elevado contenido de agua del ulluco puede afectar la estabilidad, la extractabilidad y la concentración aparente de los compuestos de interés. Asimismo, la presencia simultánea de carbohidratos, proteínas, minerales, pigmentos y compuestos fenólicos puede generar interacciones químicas y efectos de matriz que dificulten la extracción, separación, identificación y cuantificación selectiva de los analitos. Estas características hacen necesario considerar procedimientos adecuados de pretratamiento, secado, molienda, extracción y limpieza de la muestra, con el fin de mejorar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

Entre los componentes de interés, los carbohidratos no estructurales representan una fracción relevante de la matriz, especialmente por la presencia de azúcares solubles como glucosa, fructosa y sacarosa. Estos compuestos presentan alta polaridad, ausencia de cromóforos fuertes y elevada similitud estructural, lo que dificulta su determinación selectiva mediante una única

técnica analítica. Por ello, su análisis requiere estrategias complementarias que incluyan métodos espectrofotométricos para estimaciones globales y técnicas cromatográficas para la separación y determinación de azúcares individuales.

Por otra parte, los compuestos fenólicos constituyen una fracción de interés debido a su diversidad estructural, variabilidad en concentraciones y su contribución a la actividad antioxidante de las matrices vegetales. Estos compuestos pueden encontrarse en forma libre, conjugada o glicosilada, y son susceptibles a procesos de oxidación, hidrólisis o interacción con otros componentes de la matriz. En consecuencia, su determinación requiere procedimientos de extracción eficientes, etapas de limpieza que reduzcan interferencias y técnicas instrumentales con adecuada selectividad y sensibilidad.

En conjunto, la heterogeneidad composicional del *Ullucus tuberosus* condiciona el comportamiento de los analitos durante las etapas de preparación de muestra, extracción, separación y detección. Por ello, la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en esta matriz requiere estrategias analíticas optimizadas y validadas, capaces de proporcionar resultados reproducibles, selectivos y confiables.

En este contexto, la presente tesis se orienta al desarrollo y aplicación de estrategias espectrofotométricas y cromatográficas para la caracterización de cinco variedades de *Ullucus tuberosus*, contribuyendo a ampliar el conocimiento sobre su composición química, explorar diferencias entre variedades y a fortalecer su revalorización desde una perspectiva analítica.

2. Capítulo: Marco teórico y fundamentos analíticos

Considerando la complejidad composicional del *Ullucus tuberosus*, este capítulo presenta los fundamentos químicos y analíticos necesarios para comprender la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en esta matriz vegetal. Se abordan aspectos generales de la composición proximal, las características estructurales y reactividad de los analitos de interés, los principales desafíos asociados a su extracción y cuantificación, y los principios de las técnicas espectrofotométricas y cromatográficas utilizadas para su análisis.

2.1. Ulluco como matriz vegetal compleja

El ulluco (*Ullucus tuberosus*) es una planta herbácea de la familia *Basellaceae*, la única especie del género *Ullucus*. En la **Figura 2.1** se muestra una representación gráfica de la planta de ulluco. Este cultivo es originario de la región andina de América del Sur; sin embargo, su mayor diversidad genética se concentra en los Andes Centrales (Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia) [9,12].

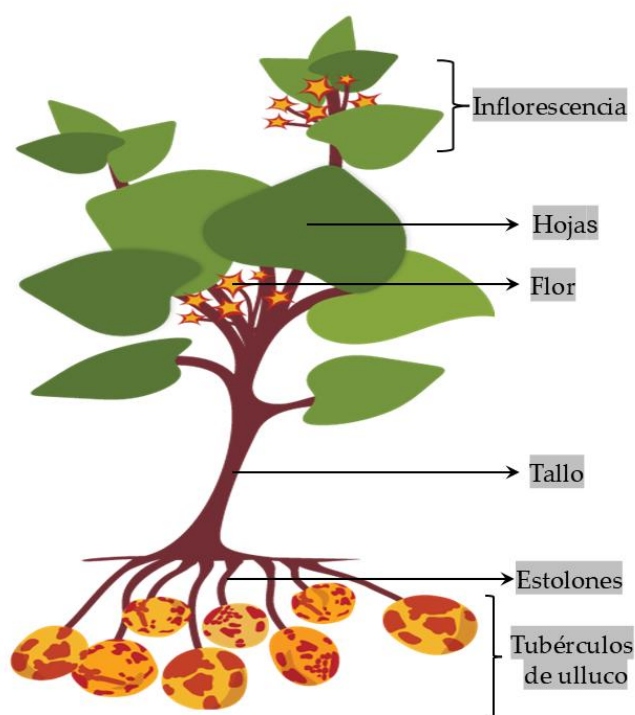


Figura 2.1 Representación gráfica de la planta de ulluco (*Ullucus tuberosus*).

Los tubérculos se forman a partir del tallo, como órgano de reserva de nutrientes, y presentan una notable diversidad fenotípica en cuanto a color, tamaño y forma, como se describió en el Capítulo 1. Su estructura tuberosa contiene carbohidratos, compuestos fenólicos, pigmentos betaláinicos, aminoácidos, minerales y otros fitoconstituyentes, cuya distribución y concentración pueden estar asociadas con la diversidad fenotípica del ulluco.

Este tubérculo constituye una matriz vegetal compleja, debido a su alto contenido de humedad, la coexistencia de micronutrientes, macronutrientes y fitoquímicos. Esta composición heterogénea puede influir en la estabilidad, extracción y respuesta analítica de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales, por lo que resulta necesario considerar estrategias adecuadas de preparación de muestra, separación y detección.

2.2. Análisis proximal y composición mineral

El análisis proximal del *Ullucus tuberosus* constituye una aproximación fundamental en la caracterización cuantitativa de su composición nutricional principal, incluyendo humedad, ceniza, proteína, lípidos, fibra, carbohidratos, complementada con la determinación de minerales específicos. El contenido de humedad representa un parámetro crítico debido a la alta proporción de agua en el tubérculo. Su determinación se realiza comúnmente mediante secado en estufa hasta peso constante, método adecuado para matrices térmicamente estables; sin embargo, en presencia de compuestos termosensibles, la liofilización se emplea como una estrategia alternativa, basada en la congelación, sublimación del hielo (secado primario) y desorción del agua residual (secado secundario), permitiendo preservar la integridad de los analitos y mejorar la estabilidad analítica de la muestra [23].

En cuanto a su composición inorgánica, la determinación de ceniza total constituye un procedimiento gravimétrico de referencia que permite estimar el contenido mineral global del tubérculo. Este residuo inorgánico está asociado a elementos esenciales como potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, fósforo y selenio [7,13]. Complementariamente, la cuantificación de proteínas mediante el método Kjeldahl, basado en digestión ácida, destilación y titulación del nitrógeno liberado, proporciona una estimación indirecta del contenido proteico, el cual ha sido reportado en rangos variables [24]. Además, la presencia de aminoácidos esenciales previamente identificados refuerza su valor nutricional.

2.3. Compuestos fenólicos: Fundamentos químicos y desafíos analíticos

2.3.1. Definición y clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios derivados de las plantas, los cuales intervienen en la función estructural, la regulación del crecimiento, el desarrollo y la pigmentación de las flores [25]. Además, participan en mecanismos de defensa frente a patógenos y en la protección contra la radiación ultravioleta [25,26]. Estos fitoquímicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, lo que les confiere una naturaleza polar. Sin embargo, su polaridad puede variar considerablemente en función de su estructura química.

Su clasificación se basa en su estructura molecular, que abarca desde moléculas simples hasta complejas de alto peso molecular, como se muestra en la **Figura 2.2**. Entre los principales grupos se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbencenos y ligninas, los cuales pueden encontrarse en forma libre o conjugada con otras biomoléculas, como los carbohidratos [27]. Estos compuestos contribuyen a las propiedades sensoriales y a la actividad

antioxidante de matrices vegetales, características que se relacionan con su estructura química, especialmente con el número y la posición de los grupos hidroxilo en la molécula.

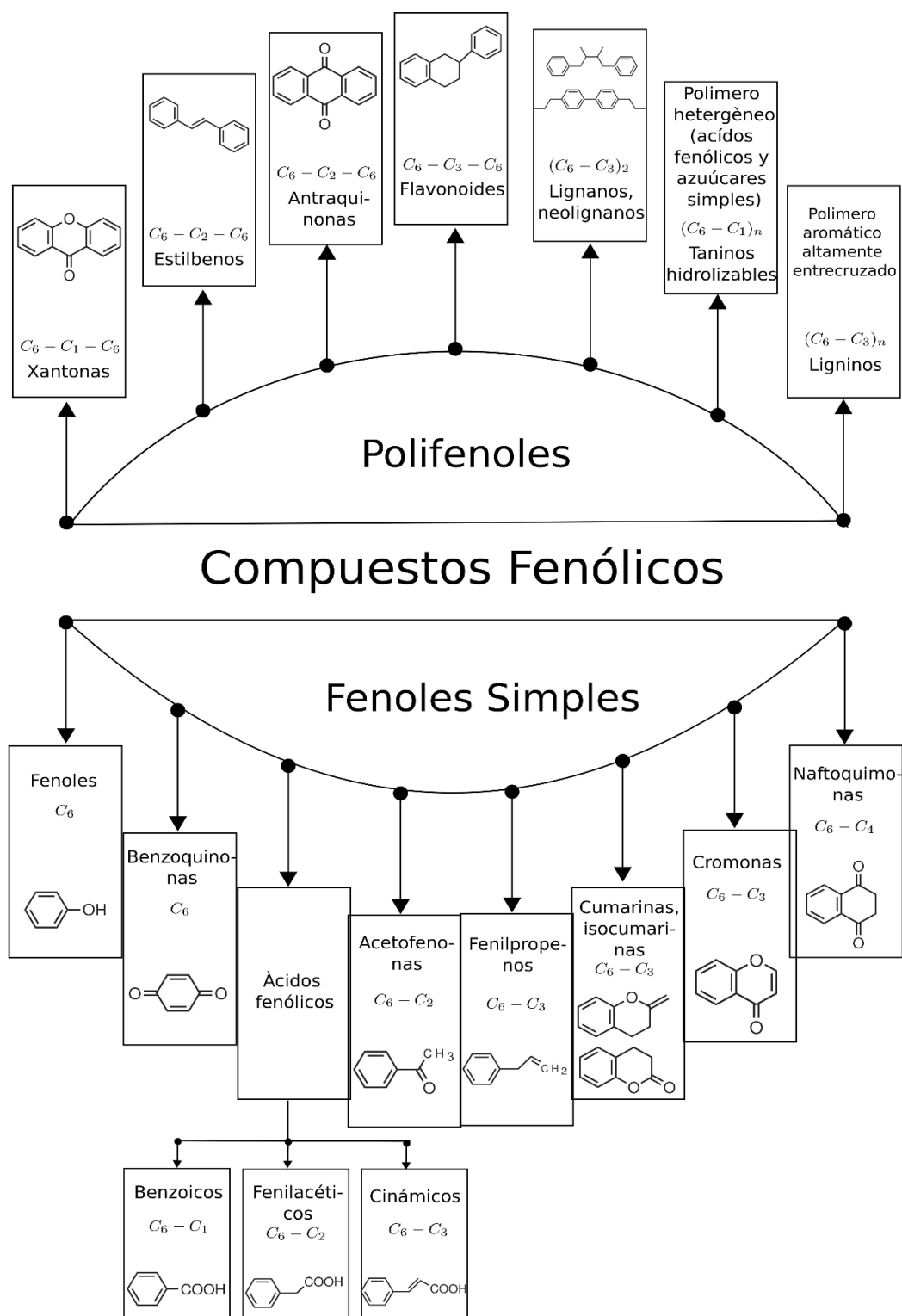


Figura 2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos según su estructura química.

Los tubérculos cultivados en la región andina presentan una amplia variedad de compuestos fenólicos, siendo los ácidos fenólicos y flavonoides los mayores constituyentes [14]. Su distribución en la estructura tuberosa es heterogénea, ya que pueden encontrarse tanto en la pulpa o parte interna como en los tejidos externos, como piel o cáscara.

2.3.2. Ácidos fenólicos y flavonoides

La diversidad estructural de los ácidos fenólicos y flavonoides depende del número y la posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático, lo que genera diferentes moléculas dentro de cada subgrupo.

2.3.2.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos que tienen un anillo fenólico con al menos un grupo de ácido carboxílico, y constituyen un grupo específico de ácidos orgánicos naturales que se clasifican principalmente en dos estructuras básicas: los derivados del ácido hidroxibenzoico y los derivados del ácido hidroxicinámico [28]. En la **Figura 2.3** se muestra la representación estructural de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.

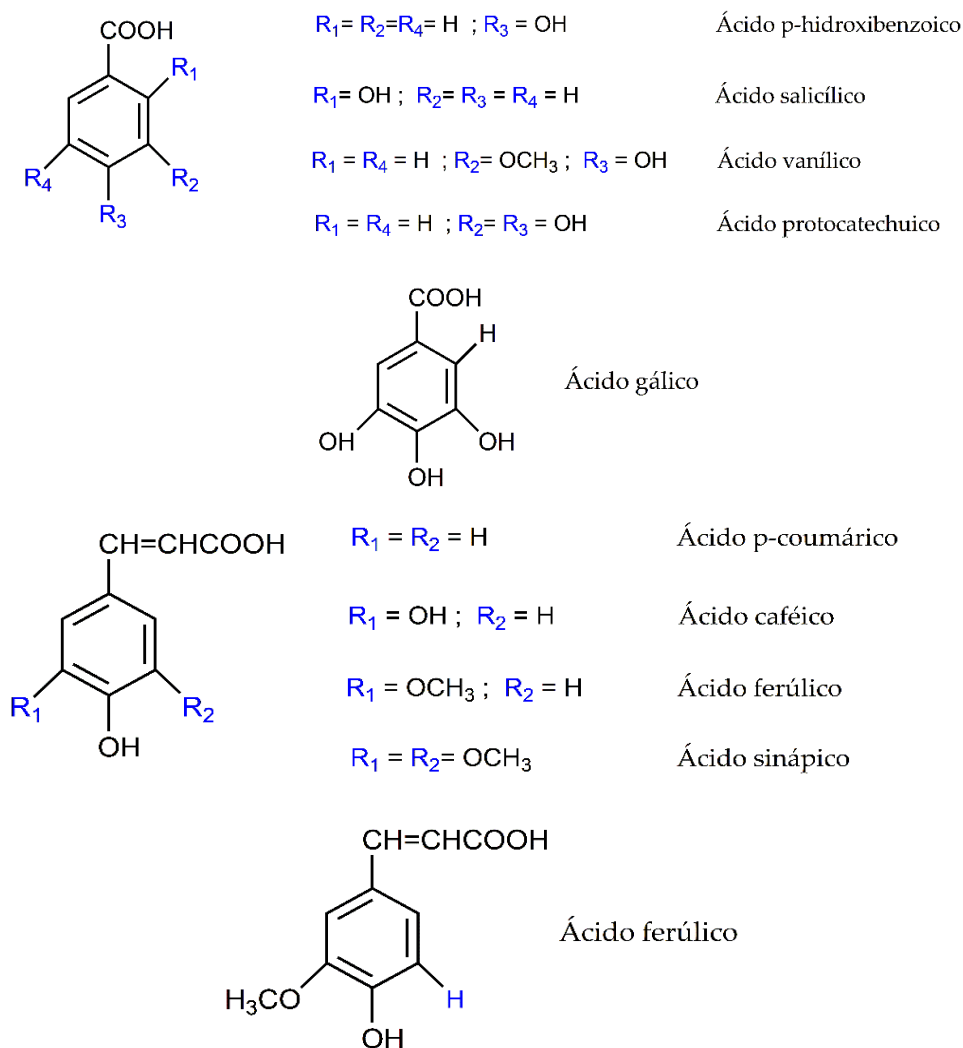


Figura 2.3 Estructuras representativas de los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxibenzoicos representan uno de los subgrupos más simples de los compuestos fenólicos, caracterizados por poseer estructuras químicas básicas de tipo C₆ o C₆-C₁, y por su participación en diversas funciones biológicas y procesos fisiológicos de la planta como la germinación de las semillas y el crecimiento vegetal [28]. El ácido gálico es el compuesto más representativo de este subgrupo.

Los ácidos hidroxicinámicos presentan una estructura básica de tipo C₆-C₃, y participan en la regulación de procesos fisiológicos de la planta [28]. Los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico son representantes de este subgrupo y pueden encontrarse en forma libre o unidos químicamente a otras moléculas en los tubérculos, como el ácido clorogénico que se forma por la unión del ácido cafeico y el ácido quínico.

2.3.2.2. Flavonoides

El término flavonoide proviene del latín “flavus”, que significa “amarillo”, en referencia al color característico de muchos compuestos pertenecientes a este grupo [29]. Desde el punto de vista estructural, los flavonoides comparten un esqueleto básico C₆-C₃-C₆, constituido por dos anillos aromáticos (A, B) unidos mediante un anillo heterocíclico (C) [30]. Además, presentan uno o más grupos hidroxilo unidos a los anillos aromáticos, cuyas variaciones en número, posición y grado de sustitución determinan sus propiedades químicas, actividad biológica y comportamiento analítico.

Existen varios subgrupos de flavonoides, cuya clasificación se basa en el estado de oxidación del anillo heterociclo (anillo C) y en la posición del anillo B [29]. En la **Figura 2.4** se muestran sus estructuras químicas representativas.

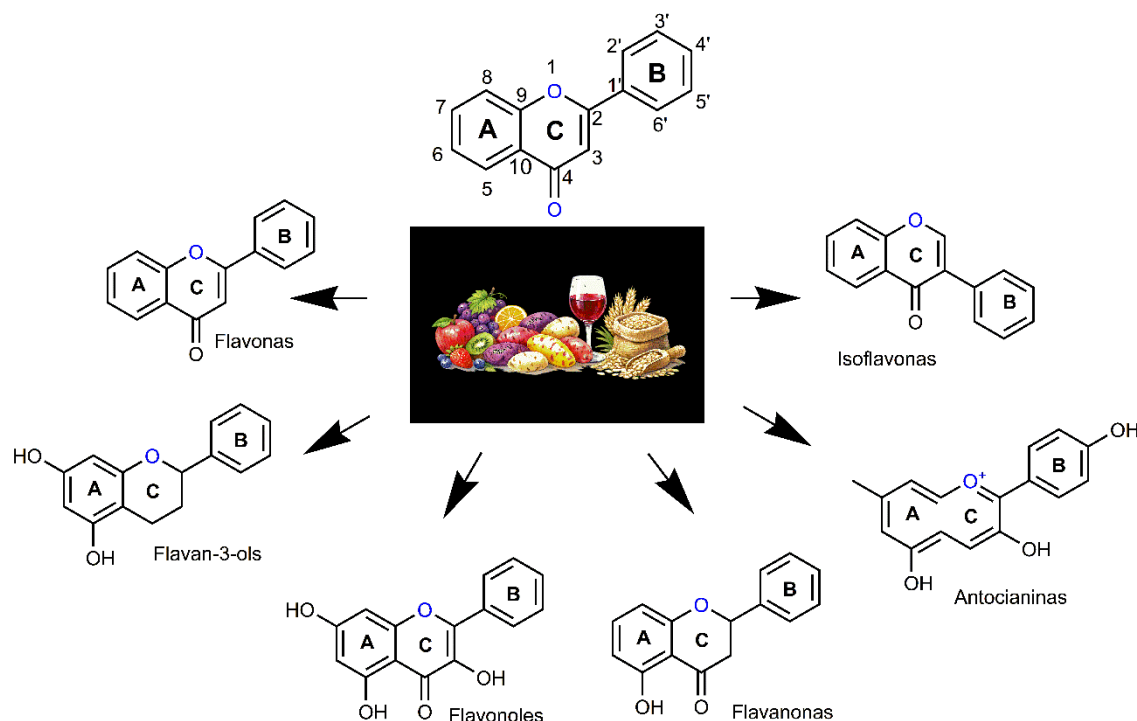


Figura 2.4 Estructura general y clasificación de los flavonoides.

En cada subgrupo se encuentra una amplia variedad de compuestos que se diferencian por el número y la posición de los grupos hidroxilo y los distintos sustituyentes que pueden presentar (R = azúcares, ácidos orgánicos, metilos). Por ejemplo, los glucósidos que son los sustituyentes mayoritarios en los flavonoides pueden estar unidos de dos formas: como O-glucósidos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) o como C-glucósidos ligados a través de enlaces carbono-carbono.

- **Flavonoles:** Se caracterizan por presentar un grupo ceto en C₄, una insaturación entre C₂ y C₃ y un grupo hidroxilo en C₃. Constituyen el subgrupo frecuentemente reportado en matrices vegetales y han sido descritos en distintos tubérculos, siendo la quercetina el principal representante [14]. Su biosíntesis está asociada a la exposición lumínica, por lo que se acumula preferentemente en tejidos externos de la planta o del tubérculo.
- **Flavonas:** Poseen una estructura similar a los flavonoles, con un grupo ceto en C₄ y una insaturación entre C₂ y C₃, pero carecen del grupo hidroxilo en C₃. Este grupo de compuestos es menos abundante en los alimentos.
- **Flavanonas:** Son análogas a las flavonas, pero presentan un anillo C saturado. Se encuentran a menudo glicosiladas en C₇ y principalmente en cítricos, tomates y plantas aromáticas [30].
- **Isoflavonas:** Se distinguen por la posición del anillo B, unido al carbono C₃ del anillo C. Pueden encontrarse como agliconas o conjugadas con azúcares [30,31]. Este subgrupo se encuentra principalmente en alimentos leguminosos [32].
- **Antocianidinas:** Son pigmentos hidrosolubles responsables del color rojo, púrpura y azul de los alimentos y plantas [33]. Estos se encuentran generalmente como glucósidos (antocianinas) que constituyen uno de los subgrupos más relevantes de los flavonoides tanto por sus características de pigmentación como por su actividad antioxidante. No obstante, en el caso del ulluco, la coloración del tubérculo ha sido asociada principalmente a pigmentos betalaínicos descritos para esta matriz.
- **Flavanoles o flavan-3-oles:** Presentan un anillo C saturado y un grupo hidroxilo en C₃, pueden encontrarse como monómeros (catequina, epicatequina), oligómeros (procianidinas) o polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Se caracterizan por su capacidad reductora y por su contribución a la actividad antioxidante de distintas matrices vegetales [34].

En general, los flavonoides participan en procesos fisiológicos relevantes en matrices vegetales, como la pigmentación, defensa frente al estrés ambiental y la regulación metabólica. Su contenido y distribución dependen de factores genéticos, agroambientales, estado de madurez, almacenamiento y procesamiento, lo que influye directamente en su concentración y en la respuesta analítica observada.

2.3.3. Estabilidad y reactividad

Los compuestos fenólicos presentan una estabilidad química variable que depende de su estructura química, así como también de factores como pH, temperatura, exposición a la luz, y la actividad enzimática de la matriz [35]. Estos compuestos pueden sufrir procesos de oxidación,

hidrólisis, isomerización y polimerización, durante el almacenamiento, procesamiento y preparación de la muestra. En el ulluco, además, pueden interactuar con otros metabolitos, modificando su solubilidad, disponibilidad química y comportamiento analítico.

2.3.4. Desafíos analíticos en la determinación de compuestos fenólicos

La determinación de compuestos fenólicos en *Ullucus tuberosus* representa un desafío analítico debido a la complejidad de su matriz, la diversidad estructural, el amplio rango de polaridades y la presencia en forma libre, conjugada o unida a macromoléculas. Estas características influyen directamente en su estabilidad, extractabilidad y comportamiento durante las etapas de preparación de la muestra, separación y detección.

La coexistencia de carbohidratos, proteínas, pigmentos hidrosolubles y otros metabolitos puede generar efectos de matriz y, en consecuencia, afectar parámetros analíticos como la recuperación, la selectividad y la reproducibilidad del análisis. Asimismo, la baja concentración de determinados compuestos fenólicos exige el empleo de procedimientos de extracción eficientes, etapas de limpieza que reduzcan las interferencias de la matriz y técnicas instrumentales de alta resolución, sensibles y selectivas.

En consecuencia, la caracterización de compuestos fenólicos en ulluco requiere estrategias analíticas que integren extracción optimizada, limpieza de la muestra cuando corresponda, separación cromatográfica y detección selectiva, junto con la evaluación de parámetros analíticos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

2.4. Carbohidratos no estructurales: Fundamentos químicos y analíticos

2.4.1. Definición y clasificación

Los carbohidratos están compuestos por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Tradicionalmente se han representado mediante la fórmula empírica general aproximada $CX(H_2O)_n$ y, aunque existen excepciones derivadas de modificaciones estructurales, sustituciones químicas o procesos de oxidación y reducción [36].

Su clasificación de carbohidratos puede realizarse según diferentes criterios, entre ellos su estructura química (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcares, fosfato de azúcares), la ubicación del grupo funcional carbonilo $C=O$ (en aldosas o cetosas), el número de átomos de carbono, y su distribución en la planta (carbohidratos estructurales y no estructurales) [37].

En esta tesis se considera principalmente la clasificación basada en su función y distribución en la planta, debido a que los carbohidratos no estructurales se almacenan principalmente en órganos de reserva como los tubérculos. En contraste, los carbohidratos estructurales forman parte de las paredes celulares y contribuyen a la rigidez física de tallos, hojas y otros tejidos vegetales.

En la **Figura 2.5** se muestra un esquema de la clasificación de los carbohidratos según su distribución en las plantas.

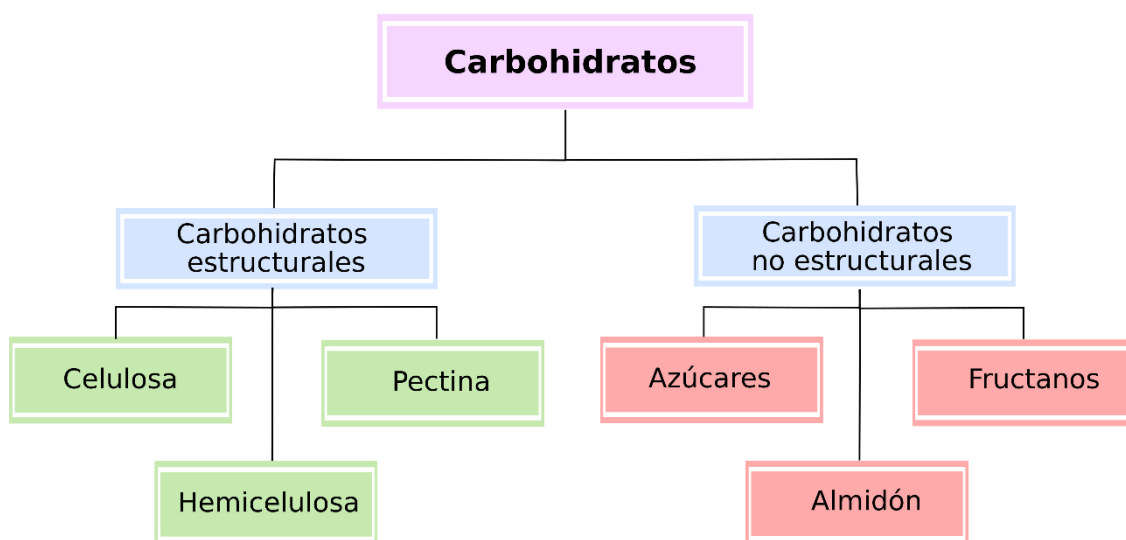


Figura 2.5 Clasificación de los carbohidratos según su función y distribución en la planta.

2.4.2. Carbohidratos no estructurales

Los carbohidratos no estructurales comprenden los azúcares de bajo peso molecular, el almidón y los fructanos conocidos también como fructooligosacáridos, los cuales son la principal fuente de reserva energética de la planta. Durante el desarrollo del tubérculo, los carbohidratos no estructurales participan en procesos de reserva, transporte y movilización de energía [38,39]. Sus concentraciones pueden variar según el estado fenológico, la madurez del tubérculo, las condiciones de almacenamiento y la actividad enzimática asociada al metabolismo del almidón y de la sacarosa.

Las propiedades fisicoquímicas de los carbohidratos no estructurales están determinadas por su peso molecular, grado de polimerización, configuración estructural y capacidad de establecer enlaces de hidrógeno con el agua. Estas características influyen en su solubilidad, viscosidad, cristalinidad, y comportamiento durante las etapas de extracción, separación y detección analítica [36].

2.4.2.1. Azúcares

Los monosacáridos, disacáridos y sus derivados constituyen los principales azúcares solubles en los tubérculos debido a su bajo peso molecular y elevada polaridad. Estas moléculas están involucradas en el sabor, madurez, calidad, autenticidad y condiciones de almacenamiento del tubérculo [40].

La glucosa, fructosa, y sacarosa son los principales azúcares presentes en la matriz vegetal, donde la glucosa puede originarse a partir de la hidrólisis de almidón, mientras que la hidrólisis de sacarosa genera glucosa y fructosa. La sacarosa está constituida por una molécula de glucosa y una de fructosa, unidas por un enlace glucosídico; además, es un endulzante por excelencia; sin embargo, la fructosa es el azúcar con mayor poder edulcorante. Otros azúcares, como xilosa, ramnosa y arabinosa, pueden formar parte de polisacáridos de la pared celular, por lo que su presencia como azúcares libres solubles dependerá de la matriz, del tratamiento de muestra y de las condiciones de extracción.

En la **Figura 2.6** se muestran las estructuras químicas de algunos azúcares simples.

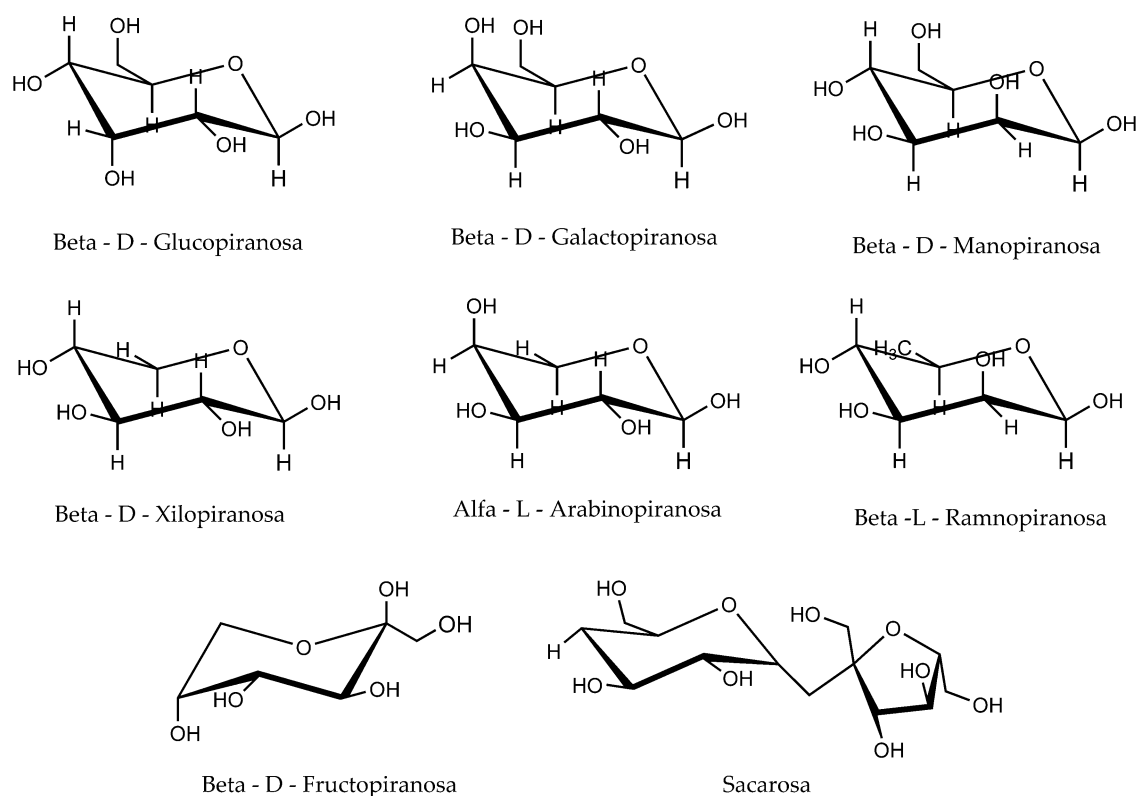


Figura 2.6 Estructuras químicas de algunos azúcares simples.

2.4.2.2. Almidón y fructooligosacáridos

El almidón está constituido por la amilosa y la amilopectina, polímeros de glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos. Es insoluble en agua fría; sin embargo en presencia de agua y a temperaturas cercanas entre 60 y 75 °C, los gránulos de almidón absorben el agua, se hinchan y aumentan la viscosidad del sistema [41].

Por otro lado, los fructanos (inulina, oligosacáridos y fructooligosacáridos) son moléculas polares que establecen fuertes puentes de hidrógeno con el agua, están formados principalmente por unidades de fructosa unidas mediante enlaces β (2-1) y se encuentran unidas a una molécula de glucosa al final de su estructura [42]. Estas moléculas participan en la formación de geles, poseen propiedades humectantes, mejoran la estabilidad de emulsiones y espumas y han demostrado efectos prebióticos.

Aunque en esta investigación no se contempla la determinación directa de almidón ni de fructooligosacáridos, resulta pertinente describir brevemente sus características debido a su relación con la composición global de carbohidratos del tubérculo y su posible contribución a la formación de azúcares de menor peso molecular.

2.4.3. Desafíos analíticos en la determinación de carbohidratos no estructurales

La determinación de carbohidratos no estructurales en matrices vegetales representa un desafío analítico debido a su amplia diversidad estructural, alta polaridad, amplio rango de

concentración y coexistencia con otros componentes de la matriz. En tubérculos, estos analitos constituyen una fracción mayoritaria, pero su similitud estructural y diferencias leves de polaridad dificultan su separación, identificación y cuantificación selectiva.

Adicionalmente, la alta polaridad de los carbohidratos no estructurales, baja volatilidad y ausencia de cromóforos limitan su detección directa mediante técnicas espectrofotométricas y dificultan su análisis cromatográfico. En particular, su determinación mediante cromatografía de gases requiere etapas previas de derivatización para incrementar su volatilidad y estabilidad térmica, mientras que en la cromatografía líquida la elección de la columna de separación y del sistema de detección resulta crítica debido a la variabilidad de sus estructuras químicas y a las limitaciones de detectores universales.

Por otra parte, la extracción de carbohidratos no estructurales es una etapa crítica del proceso analítico, ya que la presencia de compuestos fenólicos, proteínas, y otros fitoconstituyentes puede generar efectos matriz, afectando la recuperación de los analitos y causando variabilidad en la respuesta analítica. En consecuencia, la determinación de carbohidratos solubles totales, azúcares reductores y azúcares simples requiere estrategias analíticas que integren procedimientos de extracción optimizados, etapas adecuadas de preparación de muestra y técnicas analíticas avanzadas capaces de garantizar una determinación analítica selectiva y confiable en matrices vegetales complejas como el *Ullucus tuberosus*, cuya información metodológica es limitada para esta matriz en particular.

2.5. Preparación de la muestra

La extracción sólido-líquido, basada en la transferencia de masa entre una matriz sólida y un solvente, junto con técnicas emergentes como la extracción asistida por ultrasonido (EAU), son estrategias ampliamente utilizadas en la preparación de muestras para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos en matrices vegetales complejas. La eficiencia del proceso de extracción depende de diversos factores. Entre ellos están:

- El contenido de humedad en la muestra, ya que puede afectar la difusión del solvente y la transferencia de masa. Por esta razón, suele recurrirse a procesos de secado controlado, como la liofilización, que permite preservar la integridad química de compuestos termosensibles, como los compuestos fenólicos.
- La preparación del sólido, ya que una molienda o trituración incrementa el área superficial de contacto entre la matriz y el solvente, favoreciendo la liberación de los analitos localizados tanto en la superficie como en estructuras intracelulares.
- La elección del solvente de extracción, el cual constituye un factor crítico, ya que debe considerar polaridad, selectividad, capacidad de solubilización de los analitos, estabilidad química y toxicidad. En este contexto, las mezclas hidroalcohólicas, especialmente etanol-agua, han sido ampliamente utilizadas debido a su capacidad para extraer compuestos de distintos grados de polaridad y minimizar efectos de matriz. Sin embargo, la proporción de solventes debe optimizarse para maximizar los rendimientos de extracción.

- La temperatura de extracción influye significativamente sobre la solubilidad y difusión de los analitos. Aunque un aumento de la temperatura puede favorecer la transferencia de masa y mejorar los rendimientos de extracción, también puede inducir transformaciones químicas o procesos de degradación, especialmente en los compuestos fenólicos.
- Por ello, estos factores deben ser evaluados para garantizar una extracción adecuada y eficiente de compuestos fenólicos y carbohidratos.

2.5.1. Extracción asistida con ultrasonido (EAU)

La extracción asistida por ultrasonido es una técnica que emplea ondas ultrasónicas de frecuencia superior a 20 kHz, las cuales generan ciclos de compresión y rarefacción en el medio líquido que induce la formación, crecimiento y colapso de microburbujas (cavitación), que provocan la ruptura de las células del tejido vegetal y facilitan la liberación de los compuestos de interés hacia el solvente de extracción [43]. Este fenómeno incrementa la permeabilidad de la pared celular y mejora la transferencia de masa, que se ve reflejada en una extracción eficiente de analitos de interés desde la matriz vegetal. En la **Figura 2.7** se muestra gráficamente la generación de microburbujas en la extracción asistida por ultrasonido (EAU).

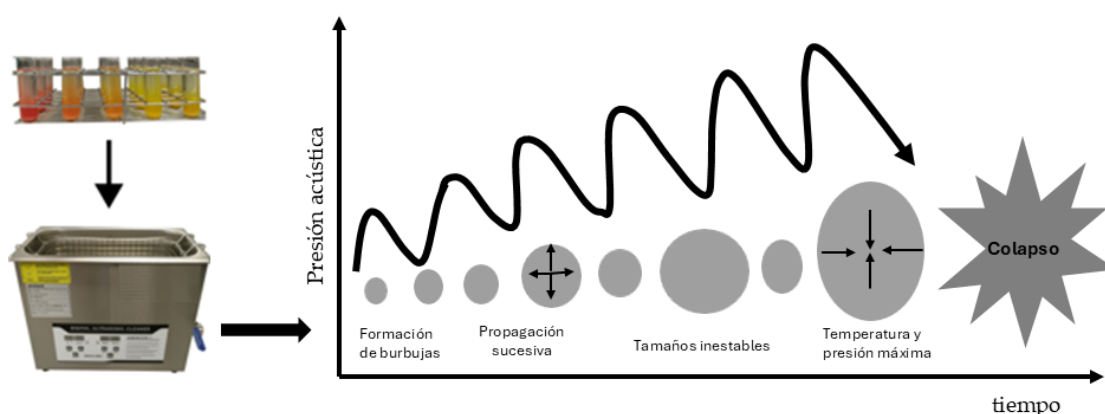


Figura 2.7 Generación de microburbujas en la extracción asistida por ultrasonido (EAU).

La eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido depende de variables instrumentales y experimentales, tales como la frecuencia y potencia ultrasónica, el tiempo de sonicación, la temperatura, el tamaño de partícula, la relación sólido-líquido y la composición del solvente extractor [44]. En términos generales, el aumento de la transferencia de masa generado por la cavitación favorece la liberación de analitos desde la matriz vegetal hacia el solvente. Sin embargo, condiciones excesivas de temperatura o tiempo de extracción pueden inducir degradación o transformación de compuestos sensibles, por lo que estas variables deben optimizarse según la naturaleza de los analitos y de la matriz.

La EAU es una técnica simple, rápida, eficiente y de bajo costo frente a las técnicas convencionales, permite obtener mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos o carbohidratos en tiempos cortos y con menor volumen de solvente, y se puede procesar varias muestras de forma simultánea [43]. Sin embargo, el rendimiento de extracción depende de la optimización de factores como el tiempo de sonicación, la temperatura, el tamaño de partícula, la relación sólido-líquido y la composición del solvente extractor, ya que condiciones inadecuadas pueden provocar bajos rendimientos de extracción o degradación de compuestos termosensibles. Para la optimización de estos factores, es frecuente el empleo de herramientas estadísticas como los diseños unifactoriales y la metodología de superficie respuesta, que permiten evaluar de manera sistemática el efecto de los factores experimentales y sus interacciones sobre la respuesta analítica.

En esta investigación, la extracción asistida por ultrasonido se utilizó como estrategia de preparación de muestra para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en variedades de *Ullucus tuberosus*. Para los compuestos fenólicos, las condiciones de extracción se optimizaron mediante un diseño unifactorial, considerando la composición del solvente etanol-agua, el tiempo y la temperatura de extracción. Para los carbohidratos solubles totales, se aplicó un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, con el fin de evaluar el efecto de estas variables y sus interacciones sobre la eficiencia de extracción.

2.5.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE en fase inversa es una técnica de preparación de muestra que emplea una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar o moderadamente polar, en la que los analitos de naturaleza media o poco polar se retienen por interacciones hidrofóbicas [45]. Posteriormente, los compuestos de interés se recuperan mediante su elución con un disolvente adecuado, permitiendo su concentración y purificación. Entre sus principales ventajas se incluyen la mínima manipulación de la muestra, obtención de extractos purificados, reducción de interferencias de matriz, menor consumo de disolventes y posibilidad de automatización del proceso.

Esta técnica de extracción mediante SPE-C18 o SPE-C8 se emplea principalmente como etapa de preconcentración y limpieza de muestra previa al análisis de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS. Su aplicación es necesaria debido a que los compuestos fenólicos pueden estar presentes en bajas concentraciones junto a compuestos interferentes como ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos polares, los cuales se eliminan durante la etapa de lavado con solventes polares. Posteriormente, la fracción fenólica se recupera mediante elución con solventes de mediana polaridad, mezclas hidroorgánicas o solventes orgánicos acidificados, mejorando así la selectividad y sensibilidad del análisis instrumental.

2.6. Técnicas instrumentales y métodos de detección

La determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en *Ullucus tuberosus* requiere el uso de técnicas analíticas complementarias, debido a las diferencias en polaridad, estabilidad térmica, volatilidad, presencia o ausencia de cromóforos, rango de concentración y comportamiento cromatográfico de estos analitos. Los compuestos fenólicos pueden ser determinados mediante técnicas espectrofotométricas y cromatográficas acopladas a

detectores UV/Vis, DAD o MS/MS, mientras que los carbohidratos, debido a su baja absorción en el UV/Vis y alta polaridad, requieren métodos colorimétricos específicos o detectores alternativos, como ELSD. En el caso de GC/MS, los carbohidratos requieren derivatización previa para transformarse en compuestos menos polares, más volátiles y térmicamente estables. En este contexto, a continuación se describen las técnicas instrumentales utilizadas en esta investigación.

2.6.1. Espectrofotometría UV/Vis

La espectrofotometría UV/Vis es una técnica analítica basada en la absorción de la radiación electromagnética en las regiones ultravioleta (200 – 400 nm) y visible (400 – 800 nm), capaz de inducir transiciones electrónicas en átomos y moléculas [46]. Su principio se basa en la ley de Lambert-Beer, que establece una relación directa entre la absorbancia, la concentración del analito y la longitud del paso óptico. Debido a su simplicidad, rapidez y sensibilidad, esta técnica es ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de compuestos que presentan grupos cromóforos o que pueden generar productos coloreados mediante reacciones específicas.

Los métodos colorimétricos Folin-Ciocalteu y FRAP son ampliamente utilizados para la determinación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante, respectivamente. Por su parte, los carbohidratos solubles totales y los azúcares reductores pueden ser determinados mediante los métodos fenol-sulfúrico y ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA), respectivamente. A continuación se describen los fundamentos analíticos de estos métodos para su aplicación en muestras de *Ullucus tuberosus*.

2.6.1.1. Método Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico total

La reacción se basa en la reducción de los derivados aniónicos de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (reactivo Folin-Ciocalteu) por los compuestos antioxidantes en medio alcalino (pH= 10), generando un complejo coloreado de color azul cuya intensidad es proporcional al contenido fenólico total, con absorción en la región visible, cuya longitud de onda de medición puede variar según el protocolo utilizado [47,48]. Su rendimiento depende del tiempo y la temperatura de incubación, siendo más estable a temperatura ambiente y tiempos de incubación entre 1 y 6 horas. Temperaturas mayores a 40 °C pueden acelerar la degradación del color formado. El ácido gálico se utiliza comúnmente como solución estándar para la cuantificación del contenido fenólico total mediante espectrofotometría UV/Vis [49,50]. En la **Figura 2.8** se muestra la reacción colorimétrica del método Folin-Ciocalteu.

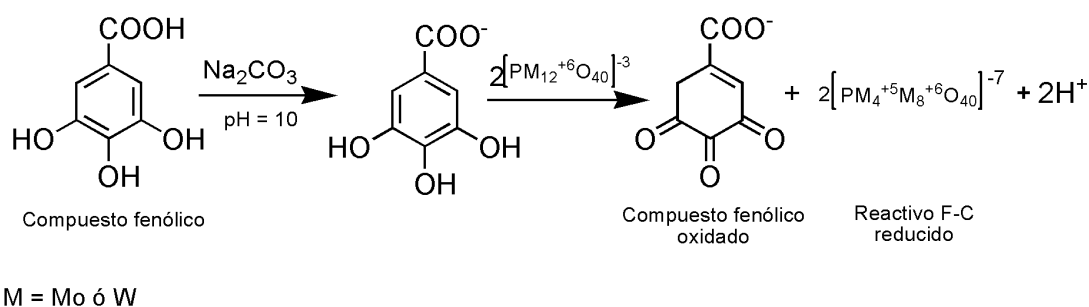


Figura 2.8 Reacción general colorimétrica del método Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico total mediante espectrofotometría UV/Vis.

La reducción de los derivados aniónicos de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico por los compuestos antioxidantes en una solución alcalina provoca un cambio de color de amarillo a azul, y la intensidad del cambio de color es directamente proporcional a la actividad reductora de los compuestos fenólicos [47]. En esta tesis, la medición del ensayo Folin-Ciocalteu se realizó a 700 nm, de acuerdo con las condiciones experimentales descritas en la metodología.

La presencia de azúcares como la glucosa, sacarosa, ramnosa, arabinosa, manosa y xilosa en la matriz vegetal no presenta cambios significativos en la respuesta del ensayo Folin-Ciocalteu a temperatura ambiente o en incubación a 50 °C [51]. Sin embargo, una concentración alta de fructosa puede provocar una sobreestimación en la cuantificación de compuestos fenólicos.

2.6.1.2. Método FRAP para la determinación de la actividad antioxidante

El método colorimétrico de poder antioxidante reductor ferroso, conocido por sus siglas en inglés como FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el complejo Fe^{3+} -TPTZ (Ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine), donde un electrón es transferido al ión férrico para convertirlo en el complejo Fe^{2+} -TPTZ (Ferrous tripyridyltriazine) [49]. En la **Figura 2.9** se muestra la reacción colorimétrica del complejo formado.

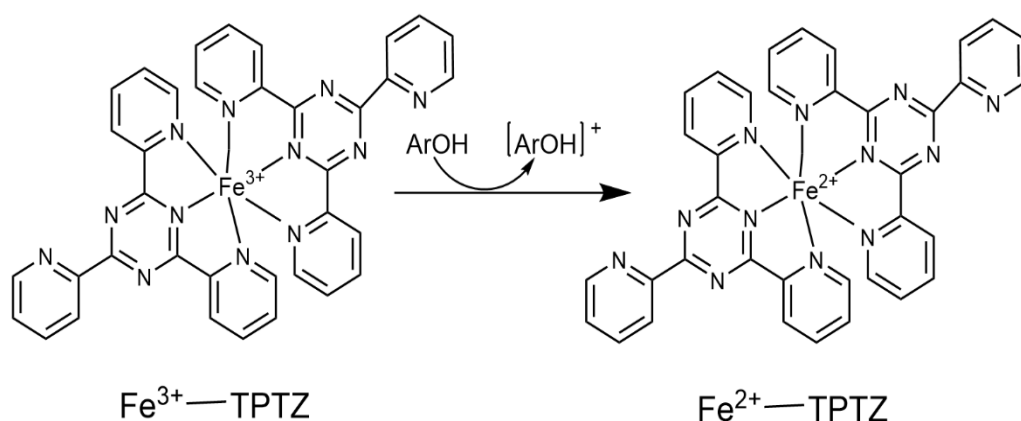


Figura 2.9 Mecanismo de reacción del poder antioxidante reductor férrico (FRAP): ArOH representa el antioxidante y $[\text{ArOH}]^+$ representa un antioxidante oxidado [52]

La transformación de una solución incolora (Fe^{3+} -TPTZ) a una solución de color azul (Fe^{2+} -TPTZ) se produce en condiciones ácidas a $\text{pH}=3.6$ para mantener la solubilidad del hierro [27][52]. La actividad antioxidante es determinada como un incremento en la absorbancia entorno a 593 - 597 nm, dependiendo del protocolo utilizado (en esta tesis, la absorbancia del ensayo FRAP se midió a 597 nm) y los resultados son expresados como equivalentes micromolar de Fe^{2+} o en relación con un antioxidante estándar, comúnmente en equivalentes Trolox [53]. Su desempeño depende de condiciones experimentales como el tiempo de reacción y la temperatura de incubación, las cuales pueden variar ampliamente según el protocolo, desde pocos minutos hasta una hora y en rangos de temperatura ambiente hasta 40 °C.

Este método colorimétrico es rápido, sensible, reproducible y de bajo costo, adecuado para análisis rutinarios de capacidad antioxidante, con resultados comparables a otros ensayos como ABTS•+ [49].

2.6.1.3. Método fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos solubles totales

El método fenol-sulfúrico desarrollado por Dubois et al. [54] consiste en una reacción colorimétrica no estequiométrica, que se basa en la hidrólisis ácida de polisacáridos y oligosacáridos a azúcares simples, los cuales generan derivados furfurales que reaccionan con el fenol para producir un complejo colorado amarillo-naranja que absorbe a una longitud de onda de 490 nm. La glucosa es empleada comúnmente como estándar analítico para la cuantificación de carbohidratos solubles totales. En la **Figura 2.10** se muestra la reacción general del método colorimétrico.

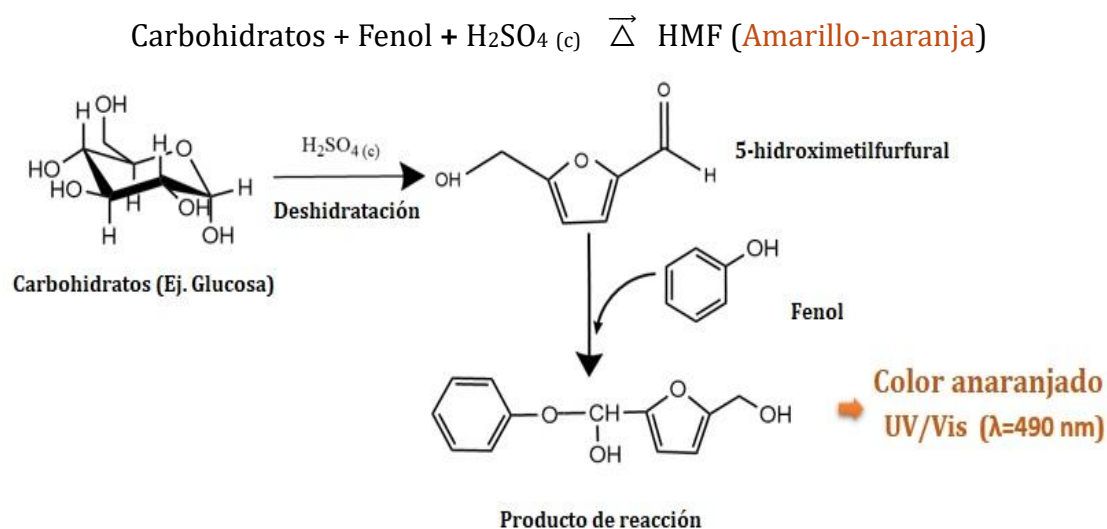


Figura 2.10 Reacción general colorimétrica del método fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos solubles totales.

Este método es ampliamente utilizado por su simplicidad, bajo costo, estabilidad de reactivos y reproducibilidad en matrices vegetales complejas, aunque se requieren precauciones por la toxicidad del fenol.

En comparación con otros métodos colorimétricos como la antrona y el resorcinol, varios estudios describen que el método fenol-sulfúrico es adecuado para la determinación global de carbohidratos en alimentos y matrices vegetales, y además, los reactivos empleados son estables, económicos y fácilmente disponibles. No obstante, se debe evitar la exposición prolongada al reactivo fenol ya que es una sustancia nociva para la salud.

2.6.1.4. Método DNSA para la determinación de azúcares reductores

El método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) desarrollado por Miller, G. L. [55], se basa en la oxidación del grupo carbonilo de los azúcares reductores a ácido carboxílico -COOH en medio alcalino, mientras que el DNSA se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, generando un complejo coloreado marrón-rojizo, cuya absorbancia se mide a 540 nm mediante

espectrofotometría UV/Vis. La glucosa se utiliza comúnmente como estándar analítico para la cuantificación de azúcares reductores.

En la **Figura 2.11** se muestra la reacción colorimétrica.

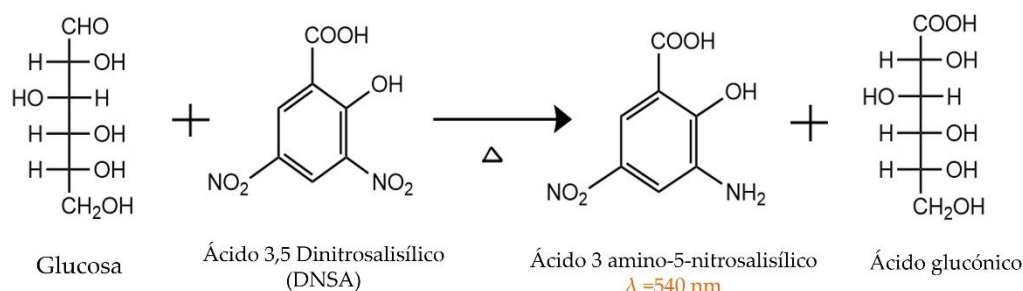


Figura 2.11 Reacción colorimétrica DNSA para la determinación de azúcares reductores.

Este método también se caracteriza por su simplicidad, bajo costo, estabilidad de reactivos y reproducibilidad para su análisis en matrices vegetales complejas.

2.6.2. UHPLC-ESI-MS/MS

El sistema UHPLC-ESI-MS/MS integra técnicas de separación y detección complementarias para la caracterización estructural, el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos fenólicos en matrices complejas. En primer lugar, la UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) permite la separación de los analitos con alta eficiencia y resolución mediante columnas con tamaño de partícula menor a 2 μm en condiciones de alta presión. Posteriormente, el DAD (Diodo Array Detector) proporciona información espectral basada en la absorción de los compuestos y tiempos de retención para comparar con las soluciones estándar comerciales, permitiendo su detección y cuantificación según sus propiedades cromóforas. En paralelo, la ESI-MS/MS (Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry) permite inicialmente la ionización suave de los analitos en fase líquida y, seguidamente, proporciona información del cromatograma de iones totales, iones moleculares $[\text{M-H}]^-$ o $[\text{M-H}]^+$, espectros de masas y patrones de fragmentación en modos SCAN, SIM y SRM. Esta combinación instrumental permite resolver analitos con estructuras químicas similares y detectar compuestos presentes a niveles traza, mejorando la selectividad, sensibilidad y confiabilidad del análisis. Asimismo, reduce significativamente el volumen de inyección de muestra, el consumo de la fase móvil y el tiempo total de análisis.

Los compuestos fenólicos son monitoreados entre 190 y 380 nm, debido a que los derivados del ácido benzoico presentan máximos de absorción entre 200 y 290 nm y los derivados hidroxycinámicos muestran una banda adicional entre 270 y 360 nm porque presentan una mayor conjugación [56]. No obstante, las longitudes de onda más utilizadas para la detección de ácidos fenólicos son 210, 254 y 280 nm, aunque no siempre corresponden al máximo de absorción. Los flavonoides absorben la radiación ultravioleta debido a que sus estructuras químicas poseen anillos aromáticos conjugados, por lo que presentan dos máximos de absorción, uno entre 240-285 nm correspondiente al anillo A, y otro entre 300-560 nm relacionado con el patrón de sustitución y conjugación del anillo C [57]. Estas propiedades espectrales permiten su

identificación según sus subgrupos, ya que las longitudes de onda varían según el tipo de flavonoide.

El mayor desafío analítico del sistema cromatográfico UHPLC-ESI-MS/MS radica en la optimización simultánea de múltiples parámetros de separación y detección para asegurar una resolución cromatográfica adecuada, sensibilidad y confiabilidad analítica en la determinación de compuestos fenólicos en matrices complejas.

2.6.3. HPLC-ELSD

El sistema HPLC-ELSD es una técnica alternativa que permite detectar compuestos no volátiles y termoestables, especialmente aquellos con baja o nula absorción en el UV-Vis y carentes de cromóforos, como los carbohidratos no estructurales presentes en tubérculos. El detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) mide la luz dispersada por partículas del analito formadas tras la evaporación del solvente o de la fase móvil. Su funcionamiento se basa en tres etapas consecutivas: nebulización, evaporación y detección [58]. Primero, el efluente cromatográfico se mezcla con el gas (N₂) para formar un aerosol. Luego, las microgotas que contienen el analito se evaporan en el tubo de deriva a cierta temperatura, generando las partículas del analito que atraviesan el haz de luz y dispersan la radiación, la cual es registrada por un detector óptico.

A diferencia de otros detectores, la señal generada por el ELSD no depende de las propiedades ópticas del analito, sino de la cantidad de partículas formadas. Por ello, la respuesta del detector no sigue la Ley de Lambert-Beer, sino una relación exponencial entre la masa del analito y la señal generada [59].

El detector ELSD ofrece alta estabilidad, sensibilidad y compatibilidad con elución en gradiente, lo que hace que el sistema HPLC-ELSD sea adecuado para la determinación simultánea de azúcares presentes en tubérculos como el ulluco. Sin embargo, su principal limitación es que no proporciona información estructural de los analitos, lo que restringe la utilidad para la caracterización e identificación cualitativa de compuestos presentes en la muestra [59]. Por esta razón, el ELSD suele emplearse como detector complementario junto a otros métodos de análisis para ampliar la información sobre la composición química de la matriz.

2.6.4. GC/MS

El sistema cromatográfico GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) se basa en la separación de compuestos volátiles, los cuales son transportados por una fase móvil inerte (helio o nitrógeno) a través de una columna capilar recubierta con una fase estacionaria, separándose en función de su volatilidad y afinidad por dicha fase, lo que genera distintos tiempos de retención [60]. Posteriormente, los compuestos eluidos son ionizados por impacto electrónico (EI, Electronic Impact), generando iones fragmentados que son separados según su relación carga/masa (m/z) y detectados para producir un espectro de masas característico, utilizado para la identificación estructural, confirmación cualitativa de analitos; en algunos casos, bajo condiciones debidamente optimizadas y validadas, también puede emplearse con fines cuantitativos.

Esta técnica cromatográfica ha sido ampliamente utilizada para determinar monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos de cadena corta [61,62]. Sin embargo, su análisis presenta limitaciones, ya que estos compuestos poseen alta polaridad y baja volatilidad, lo que hace necesaria una etapa previa de derivatización. La sililación es la reacción de derivatización más utilizada, ya que reemplaza hidrógenos activos por grupos trimetilsililo (TMS), generando derivados más volátiles y térmicamente estables. Además, la reacción es relativamente simple, aplicable a una amplia variedad de carbohidratos y se dispone de un gran número de reactivos de sililación, como hexametildisilazano (HMDS, hexamethyldisilazane), trimetilclorosilano (TMCS, trimethylchlorosilane), bistrimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA, bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) y N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, N-methyl-trimethylsilyltrifluoroacetamide) [63].

En esta investigación, la GC/MS se empleó principalmente para la identificación cualitativa de azúcares solubles presentes en las cinco variedades de *Ullucus tuberosus*, ya que la cuantificación es compleja debido a que se requiere una etapa previa de derivatización que debe ser optimizada. Además, la presencia de isómeros y formas tautoméricas puede generar múltiples derivados y señales analíticas, dificultando la integración cromatográfica [63]. A esto se suma la inestabilidad térmica de los azúcares y posibles degradaciones durante la derivatización o la inyección, generando variabilidad en los resultados. Por último, la escasez de patrones internos adecuados para todos los azúcares dificulta la corrección de pérdidas durante la derivatización, variaciones de inyección y efectos de matriz, afectando la precisión del método.

En conjunto, los fundamentos revisados evidencian que la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en *Ullucus tuberosus* requiere estrategias analíticas complementarias. La complejidad de la matriz, la diversidad estructural de los analitos, la presencia de compuestos interferentes y las diferencias de polaridad, volatilidad y respuesta espectroscópica justifican el uso combinado de métodos espectrofotométricos, técnicas cromatográficas y procedimientos optimizados de preparación de muestra. Estos fundamentos químicos y analíticos sustentan el desarrollo metodológico propuesto en esta tesis para caracterizar distintas variedades de ulluco.

3. Capítulo: Antecedentes científicos y analíticos

El *Ullucus tuberosus* ha sido caracterizado mediante análisis proximal y técnicas analíticas orientadas a la determinación de su composición nutricional y perfil fitoquímico. En este capítulo se revisan los principales antecedentes reportados en la literatura científica relacionados con su composición proximal y mineral, así como con la determinación de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y carbohidratos no estructurales. Esta revisión permite identificar las principales aproximaciones metodológicas utilizadas en el estudio del ulluco y establecer las brechas analíticas que sustentan el desarrollo de esta tesis.

3.1. Antecedentes sobre composición proximal y mineral del ulluco

Gran parte de los estudios sobre *Ullucus tuberosus* han abordado su caracterización nutricional mediante análisis proximal, incluyendo humedad, cenizas, proteínas, lípidos, fibra y carbohidratos totales. En la **Tabla 3.1** se resumen los resultados reportados del análisis proximal, y la **Tabla 3.2** resume los resultados reportados del contenido mineral.

Tabla 3.1 Composición proximal del *Ullucus tuberosus* reportada en la literatura.

Variedad de ulluco	Humedad (%)	Ceniza (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Fibra (%)	CT (%)	AR (%)	Ref.
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
Papalisa (fw)	86.5	-	-	-	-	-	-	[64]
Papalisa (fw)	81.95	0.47	0.24	0.072	0.03	17.24	-	[65]
Amarillo (fw)	85.55	0.14	0.09	0.001	0.01 ⁽¹⁾	0.02	-	[66]
Red (fw)	83.44	0.156	0.093	0.002	0.021 ⁽¹⁾	0.030	-	[66]
Amarillo-rosa	-	2.3	13	0.4	21 ⁽¹⁾	83	10	[13]
Puka lisas (fw)	85.95	0.86	1.17	0.15	0.90 ⁽¹⁾	11.87		[67]
Papalisas (fw)	85.63	0.79	1.04	0.12	0.85 ⁽¹⁾	12.42		[67]
Alqo lisas (fw)	85.62	0.75	1.08	0.14	0.96 ⁽¹⁾	12.42		[67]
Amarillo	87.40±0.67		8.06±0.07	0.65±0.01	6.49 ±0.41 ⁽²⁾ 7.22 ± 0.21 ⁽³⁾	5.26± 0.35	-	[68]
Rojo-morado	81.12±2.15		8.06±0.07	0.85± 0.03	34.75±2.00 ⁽¹⁾	-	-	[19]
Amarillo	79.08±2.60		9.05±0.49	0.70± 0.01	34.85±1.01 ⁽¹⁾	-	-	[19]
Amarillo	81.07± 1.97		9.67 ± 0.36	0.86± 0.04	34.29±1.11 ⁽¹⁾	-	-	[19]
Rojo-amarillo	84.41±1.58		12.19± 0.50	0.95± 0.07	37.5± 0.72 ⁽¹⁾	-	-	[19]
Rojo-morado	82.01±2.31		11.83± 0.89	0.92± 0.04	34.66±1.66 ⁽¹⁾	-	-	[19]
Rojo-morado	87.6 5.93 ± 0.05	5.4	8.5 6.25 ± 0.41	1.4 6.98± 0.39	0.5 ⁽⁴⁾ 0.25 ±0.00	84.2 14.0± 0.00	67.04 ± 0.28	[15]

Los resultados están expresados en g/100 g de peso seco; dw: (Fresh weight, peso fresco); s: desviación estándar; Los superíndices significan: (1): fibra dietaria; (2): fibra soluble; (3): fibra insoluble; (4); fibra cruda; CT: Carbohidratos totales; AR: Azúcares reductores

Tabla 3.2 Composición mineral del *Ullucus tuberosus* reportada en la literatura

Variedad de ulluco	Unidad	Na	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn	P	Cl	S	Se	Ref.
Papa lisas	mg/100 g	15.5	1297.7	-	98.2	4.9	3.2	0.3	1.1	221.2	-	-	-	[64]
-	mg/100 g fw	-	-	-	-	1.23	0.05	-	-	-	-	-	-	[65]
Amarillo-rosa	mg/100 g dw	0.87	2140	11	77	3.3	-	-	-	78	-	-	-	[13]
Puka lisas	mg/100 g fw	-	-	6.50	-	3.60	-	-	-	35.10	-	-	-	[67]
Papa lisas	mg/100 g fw	-	-	5.80	-	2.10	-	-	-	32.00	-	-	-	[67]
Alqo lisas	mg/100 g fw	-	-	5.00	-	1.90	-	-	-	28.60	-	-	-	[67]
-	mg/100 g	1	247	8	11	0.40	0.36	0.04	0.11	38	2	13	0.01	[69]
-	mg/100 g dw	30	2480	20	107	5.94	2.39	1.07	0.92	263	-	-	-	[7]
Morado	g/100 g dw		4.12 ± 0.02	0.15± 0.00	1.12± 0.03	0.03± 0.00			0.01± 0.00	0.3± 0.00	0.1± 0.00	0.15± 0.00		[15]

Na: Sodio; K: Potasio; Ca: Calcio; Mg: Magnesio; Fe: Hierro; Zn: Zinc; Cu: Cobre; Mn: Manganeseo; P: Fósforo; Cl: Cloro; S: Azufre; Se: Selenio; Co: Cobalto; Ni: Níquel; Cr: Cromo; Los resultados están expresados como el promedio ± desviación estándar; FW: fresh weight (peso fresco); DW: dry weight (peso seco).

Las investigaciones previas en el ulluco evidencian un alto contenido de humedad y bajos niveles de lípidos y la presencia de macronutrientes y micronutrientes relevantes, especialmente carbohidratos, proteínas y minerales con potenciales beneficios para la salud. En cuanto al contenido mineral, se ha descrito principalmente la presencia de sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y zinc, mientras que algunos estudios reportan también fósforo, selenio, cobre, manganeso y otros elementos traza.

En general, los estudios disponibles respaldan el valor nutricional del ulluco, sin embargo, la comparación directa entre estudios debe realizarse con cautela, debido a diferencias en la variedad analizada, origen geográfico, parte del tubérculo evaluada, tratamiento de muestra y base de expresión de los resultados. Además, la información sigue siendo fragmentada y, en muchos casos, restringida a una o pocas variedades. Esta heterogeneidad metodológica limita la comparación entre estudios y justifica la necesidad de caracterizar distintas variedades bajo condiciones analíticas comparables.

3.2. Antecedentes de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

En relación con la caracterización fitoquímica del ulluco, los estudios reportados han empleado principalmente técnicas cromatográficas acopladas a detectores UV/Vis, DAD o MS para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. En la **Tabla 3.3** se resumen antecedentes relacionados con el origen de las muestras, las variedades analizadas, compuestos fenólicos reportados y las técnicas cromatográficas utilizadas.

Los antecedentes indican la presencia de ácidos fenólicos, derivados hidroxicinámicos y flavonoides en distintas variedades de ulluco, especialmente en muestras amarillas, moradas o de coloración mixta. Sin embargo, gran parte de estos estudios se ha centrado en la identificación tentativa de compuestos, sin reportar de manera sistemática la validación de los métodos analíticos empleados. Esta limitación dificulta la comparación directa entre estudios y evidencia la necesidad de incorporar estrategias analíticas validadas, que permitan aumentar la confiabilidad de los datos y evaluar diferencias composicionales entre variedades.

Por otro lado, los métodos colorimétricos basados en espectrofotometría UV/Vis, tales como Folin-Ciocalteu, FRAP, DPPH y ABTS, han sido utilizados para la determinación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante en ulluco. En la investigación realizada por Muñoz et al. [45] se reportó que la cáscara del ulluco de la variedad roja y amarilla presentó mayor contenido fenólico y actividad antioxidante que sus respectivas pulpas. Este hallazgo sugiere la relevancia de considerar la matriz vegetal y la estrategia de preparación de muestra en la interpretación de los resultados analíticos, dado su impacto en la cuantificación de compuestos fenólicos.

En otro estudio realizado por Pacheco et al. [9] se reportó la presencia de compuestos fenólicos con actividad antioxidante mediante los métodos Folin-Ciocalteu y DPPH en la variedad amarilla-rosa. En conjunto, los antecedentes sobre compuestos fenólicos en ulluco evidencian el potencial fitoquímico del tubérculo, pero también muestran limitaciones metodológicas relacionadas con la validación analítica, las condiciones de extracción, los estándares de calibración, la variedad analizada y la expresión de resultados.

Tabla 3.3 Técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de compuestos fenólicos en *Ullucus tuberosus*

País (Ciudad)	Variedad	Compuestos fenólicos	Técnica cromatográfica (Columna)	Ref.
Ecuador	Amarillo- rosado	Muestra: cáscara+pulpa Derivado de ácido ferúlico, triptófano, quercetina diramnosilhexosido, kaempferol-O-ramnósido-rutinósido, isorhamnetina-O-diramnosilhexosido, quercetina 3-rutinosido, kaempferol-3-rutinosido, ácido ferúlico, kaempferol acetilramnosilhexosido, isorhamnetina 3-rutinosido)	HPLC- DAD-ESI/MS ⁿ (Spherisorb S3 ODS-2 C8, 150 mm×4.6mm i.d.; 3 µm particle size)	[14]
Perú	-	Muestra: cáscara+pulpa Ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina	HPLC-UV/Vis (RP SELET B - 250 mm x 4mm i.d.; 5 µm particle size)	[70]
Colombia (Pompeya)	Rojo- morado	Muestra: Harina Ácido cafeico 4-O-glucósido, kaempferol 3-O-xilosil-rutinósido, sinensetina, 3,7-dimetilquercetina, <i>p</i> -coumaroil glucosa, feruloil ácido tartárico, ácido <i>p</i> -coumárico 4-O-glucósido, Muestra: cáscara Ácido caféico 4-O-glucósido, catecol, escopoletina, tectorigenina 4'-sulfato, lariciresinol, ácido ferúlico 4-O-glucósido, quercetina 3-O-ramnosil-raimnosil-glucósido, kaempferol 3-O-xilosil-rutinósido, quercetina 3-O-rutinósido, 3,7 dimetilquercetina, <i>p</i> -coumaroil glucosa, <i>p</i> -coumaroil tirosina.	RP-HPLC-ESI-MS (Denali C18 - 150 mm×2.1mm i.d.; 3 µm particle size)	[15] [71]
Ecuador (Ambato)	Blanco	Muestra: Harina Ácido gálico	HPLC-UV/Vis (RP-18 endcapped, 5µm)	[72]
Perú (Huancavelica)	Chullcce	Muestra: cáscara+pulpa Rutina, derivado de flavonona luteolina, quercetina, kaempferol, apigenina y crisina.	HPLC-PDA (X-terra RP18, 250 mm, 5 mm, 4.6 mm)	[73]

Asimismo, se observa la necesidad de integrar métodos espectrofotométricos y cromatográficos que permitan relacionar el contenido fenólico y la actividad antioxidante con el perfil individual de compuestos fenólicos.

3.3. Antecedentes sobre carbohidratos no estructurales y azúcares solubles

En relación con los carbohidratos no estructurales, la información disponible sobre la composición de azúcares solubles en ulluco es más limitada que la existente para la composición proximal. En la **Tabla 3.4** se resumen las técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de carbohidratos no estructurales en ulluco.

Entre los estudios reportados, Gross et al. [19] han descrito la presencia de fructosa, glucosa y sacarosa como azúcares predominantes, utilizando principalmente técnicas cromatográficas como HPLC-RID. De manera similar, Pérez-Balladares et al. [20] determinaron glucosa y fructosa usando la misma técnica cromatográfica, reportando bajos contenidos de azúcares simples en las muestras evaluadas. Posteriormente, Pacheco et al. [13] confirmaron la presencia de estos compuestos en la variedad amarilla-rosa mediante GC-FID. Estos antecedentes proporcionan una primera aproximación al perfil de carbohidratos solubles del tubérculo; sin embargo, los estudios disponibles son escasos, se restringen a pocas variedades y presentan diferencias en la preparación de muestra, técnica instrumental y forma de expresión de resultados.

Tabla 3.4 Técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de carbohidratos no estructurales en *Ullucus tuberosus*.

País (Ciudad)	Variedad	Carbohidratos no estructurales	Técnica cromatográfica y columna	Ref.
Perú (Cuzco)	-	Muestra: cáscara + pulpa Fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y α -galactósidos	HPLC-RID (Spherisorb-NH ₂ , 250 mm x 4.6 mm i.d.)	[19]
Ecuador (Cotopaxi)	Amarillo- rosado	Muestra: cáscara + pulpa Fructosa, Glucosa, Sacarosa	GC-FID (DB-5HT column, 15 m x 0.32 mm x 0.10 μ m)	[13]
Ecuador (Chimborazo)	-	Muestra: cáscara + pulpa Glucosa y fructosa	UHPLC-RID (Zorbax NH ₂ – 250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μ m)	[20]

Adicionalmente, de acuerdo con los antecedentes revisados, no se encontraron reportes que apliquen HPLC-ELSD y GC/MS para el análisis de carbohidratos y azúcares solubles en distintas variedades de ulluco. La incorporación de estas metodologías resulta de interés debido a sus capacidades complementarias: HPLC-ELSD permite la separación y cuantificación de azúcares con baja absorción UV, mientras que GC/MS aporta información cualitativa mediante la identificación de derivados volátiles de carbohidratos.

Por otra parte, el contenido de carbohidratos también ha sido evaluado mediante espectrofotometría molecular UV/Vis empleando métodos colorimétricos, como fenol-sulfúrico para carbohidratos totales y DNSA para azúcares reductores [13]. Asimismo, otros estudios

reportan carbohidratos totales mediante metodologías convencionales de análisis proximal. No obstante, en muchos casos la información metodológica se presenta de manera general, sin describir procedimientos optimizados de extracción ni parámetros de validación analítica adaptados a las características particulares de esta matriz vegetal.

En conjunto, los antecedentes revisados demuestran que el ulluco ha sido estudiado principalmente desde una perspectiva nutricional y fitoquímica, con reportes sobre composición proximal, mineral, pigmentos, compuestos fenólicos y azúcares solubles. Sin embargo, la información disponible continúa siendo fragmentada, debido a diferencias en las variedades analizadas, origen geográfico, tratamiento de muestra, base de expresión de resultados y técnicas analíticas empleadas. En particular, son escasos los estudios comparativos que integren procedimientos de extracción optimizados, métodos espectrofotométricos y técnicas cromatográficas para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en distintas variedades de *Ullucus tuberosus*. Esta brecha metodológica sustenta la necesidad de desarrollar estrategias analíticas validadas y complementarias que permitan caracterizar de manera confiable la composición química de este tubérculo andino.

4. Capítulo: Planteamiento del problema

Los tubérculos cultivados en la región andina de América del Sur constituyen una fuente relevante de nutrientes y compuestos bioactivos, además de formar parte de la alimentación tradicional de diversas comunidades locales. Entre ellos, el *Ullucus tuberosus* destaca por su valor nutricional, diversidad fenotípica, adaptabilidad agronómica y potencial funcional. Sin embargo, a pesar de estas características, continúa siendo un cultivo subutilizado y comparativamente menos estudiado que otros tubérculos andinos.

La información disponible sobre la composición química del ulluco es aún limitada y fragmentada. La mayor parte de los estudios previos se ha centrado en aspectos nutricionales generales o en variedades específicas, con escasa integración entre composición proximal, perfil de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales. Además, las diferencias en origen geográfico, tratamiento de muestra, base de expresión de resultados y técnicas analíticas empleadas dificultan la comparación entre estudios y limitan la interpretación de la variabilidad composicional entre variedades.

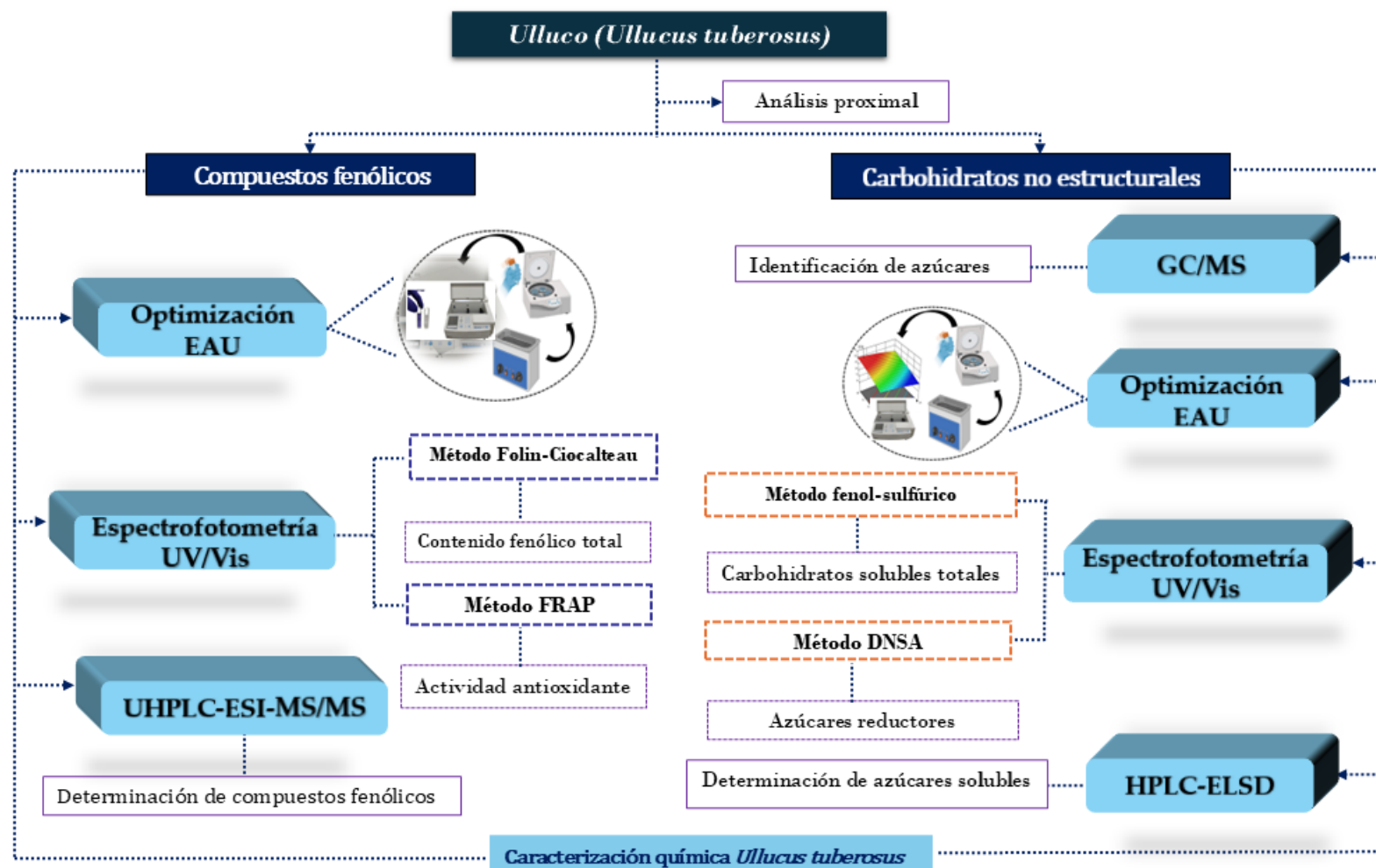
Desde el punto de vista analítico, el ulluco representa una matriz compleja debido a su alto contenido de humedad, presencia de carbohidratos, proteínas, minerales, pigmentos hidrosolubles y metabolitos secundarios de distinta polaridad. Estas características pueden afectar la extracción, separación, identificación y cuantificación selectiva de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales, especialmente cuando se encuentran en niveles bajos de concentración o en presencia de interferentes de matriz.

En este contexto, se requiere desarrollar y aplicar estrategias analíticas que integren procedimientos adecuados de preparación de muestra, extracción, separación y detección, junto con la evaluación de parámetros analíticos que permitan obtener resultados confiables. Asimismo, la aplicación de estas estrategias en distintas variedades de *Ullucus tuberosus* permitiría explorar diferencias y similitudes en su composición química bajo condiciones metodológicas comparables.

Por lo tanto, esta investigación aborda el desarrollo de estrategias analíticas para la caracterización proximal y mineral, así como para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en cinco variedades de ulluco comercializadas en mercados locales de Chile. La información generada permitirá ampliar el conocimiento sobre la variabilidad composicional de este tubérculo andino y contribuirá a su revalorización desde una perspectiva nutricional, química y analítica.

A partir de este planteamiento, se propone que la integración de estrategias de preparación de muestra, métodos espectrofotométricos y técnicas cromatográficas permitirá abordar los desafíos analíticos asociados a la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en variedades de *Ullucus tuberosus*. En la **Figura 4.1** se presenta un esquema general de la estrategia analítica desarrollada en esta investigación.

Figura 4.1 Estrategia analítica general para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en cinco variedades de *Ullucus tuberosus*.



Esta estrategia se sustenta en la complementariedad de las técnicas empleadas y en la necesidad de optimizar y validar procedimientos analíticos adecuados para una matriz vegetal compleja. En consecuencia, se plantea la siguiente hipótesis:

4.1. Hipótesis

Las estrategias de tratamiento de muestra y extracción, combinadas con la aplicación de técnicas analíticas de separación y detección, como cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (UHPLC-ESI-MS/MS), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y cromatografía líquida de alta resolución con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD), permitirán la identificación y cuantificación selectiva y confiable de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales presentes en cinco variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*). La integración de estas estrategias analíticas permitirá ampliar el conocimiento sobre la composición química de sus variedades y contribuirá a una mejor comprensión de sus propiedades funcionales.

En este sentido, se plantea el objetivo general y los objetivos específicos de esta investigación.

4.2. Objetivo general

Desarrollar estrategias analíticas para la determinación de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en cinco variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*) comercializadas en mercados locales de Chile.

4.2.1. Objetivos específicos

1. Determinar la composición nutricional de cinco variedades de ulluco mediante análisis proximal.
2. Implementar y validar métodos analíticos para la determinación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante en variedades de ulluco mediante espectrofotometría UV/Vis. Para tal efecto, se optimizará el método de extracción sólido-líquido.
3. Validar un método analítico para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en variedades de ulluco mediante UHPLC-ESI-MS/MS.
4. Implementar y validar métodos analíticos para la determinación de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores en variedades de ulluco mediante espectrofotometría molecular UV/Vis. Para tal efecto, se optimizará el método de extracción sólido-líquido.
5. Validar un método analítico para la determinación de azúcares por HPLC-ELSD en variedades de ulluco e identificar los principales azúcares solubles por GC/MS.

5. Capítulo: Metodología

5.1. Diseño general del estudio

La investigación se desarrolló a partir de cinco variedades de tubérculos de *Ullucus tuberosus* adquiridas en un mercado local de Chile. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento común de limpieza, liofilización, molienda y almacenamiento, con el fin de disponer de una matriz homogénea para los análisis posteriores. El estudio contempló tres etapas analíticas principales: i) caracterización proximal y mineral, ii) determinación de compuestos fenólicos mediante métodos espectrofotométricos y UHPLC-ESI-MS/MS, iii) determinación de carbohidratos no estructurales mediante métodos espectrofotométricos, HPLC-ELSD y GC/MS. En cada etapa se evaluaron parámetros analíticos, según correspondió, para establecer la confiabilidad de los métodos aplicados.

5.2. Muestras y tratamiento de muestra

Los tubérculos fueron adquiridos comercialmente en el mercado local “La Vega”, ubicado en la Región Metropolitana de Santiago, Chile. Fueron adquiridos un total de 10 kg de ulluco del mismo proveedor y en el mismo día para minimizar la variabilidad. Tras la adquisición, los tubérculos se seleccionaron según su uniformidad de color, ausencia visible de defectos y estado de madurez comercial similar.

La **Figura 5.1** muestra las cinco variedades de ulluco recolectadas.



Figura 5.1 Variedades de *Ullucus tuberosus* obtenidas del mercado local de Chile.

Los tubérculos se limpiaron cuidadosamente con papel absorbente y una mínima cantidad de agua desionizada para eliminar los residuos de tierra. Posteriormente, los tubérculos fueron liofilizados (cáscara/piel y pulpa), finamente molidos hasta obtener un polvo homogéneo y almacenados en un desecador a temperatura ambiente, en oscuridad, hasta su análisis. Los resultados fueron expresados en peso seco, excepto para el parámetro humedad, que fue expresado en peso fresco.

En la **Tabla 5.1** se muestra la codificación de cada muestra adquirida, la descripción de la variedad, la parte analizada y el pretratamiento de la muestra.

Tabla 5.1 Descripción de las muestras de *Ullucus tuberosus* analizadas.

Código	Descripción de la variedad según el color	Parte analizada	Tratamiento
U-1	Morado	Piel + pulpa	Liofilizado y molido
U-2	Morado-naranja	Piel + pulpa	Liofilizado y molido
U-3	Naranja-amarillo	Piel + pulpa	Liofilizado y molido
U-4	Amarillo	Piel + pulpa	Liofilizado y molido
U-5	Amarillo-verde	Piel + pulpa	Liofilizado y molido

5.3. Análisis proximal

Todos los análisis se realizaron según los procedimientos de referencia de la AOAC [74]. El contenido de humedad se determinó colocando 5 g de cada muestra fresca en un horno a 105 °C durante 4 h. (Método N° 952.08). Las muestras secas se colocaron en un horno de mufla a 550°C durante 24 h y se pesó el residuo de ceniza obtenido (Método N° 938.08). La determinación de proteínas se realizó mediante el método Kjeldahl, utilizando 1 g de cada muestra seca; el valor de nitrógeno total se multiplicó por un factor de 6.25 para estimar el contenido proteico (Método N° 968.06). Para la determinación de sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn), las muestras fueron previamente sometidas a digestión ácida con ácido nítrico y ácido perclórico según el procedimiento descrito por Paul et al. [75]. Posteriormente, las soluciones digeridas fueron analizadas mediante espectrometría de absorción atómica, utilizando un equipo Agilent Technologies, Serie 200 AA, EE. UU.

5.4. Determinación de compuestos fenólicos

5.4.1. Reactivos y soluciones estándar

Etanol absoluto ($\geq 99.5\%$), carbonato de sodio anhidro ($\geq 99.5\%$), cloruro de hierro (III) (97%), 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina ($\geq 98\%$), ($\pm$)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico ($\geq 97\%$), reactivo Folin & Ciocalteu's 2N, ácido gálico ($\geq 98\%$), ácido 4-hidroxibenzoico ($\geq 98\%$), ácido p-cumárico ($\geq 98\%$), rutina ($\geq 94\%$), quercetina dihidratada ($\geq 98\%$), (-)-epicatequina ($\geq 98\%$) y kaempferol ($\geq 90\%$) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Merck, USA). Ácido clorogénico ($\geq 98.75\%$) y ácido ferúlico fueron obtenidos de MP Biomedicals (LLC Eschwege, Alemania). Ácido cafeico ($\geq 98\%$), fue obtenido de Longmont (ChromaDex, USA). Isorhamnetina-3-rutinósido ($\geq 95\%$), kaempferol-3-rutinósido ($\geq 95\%$) y quercetina-3-glucósido ($\geq 95\%$) fueron obtenidos de Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemania). Acetonitrilo grado LC/MS gradiente (99.9% de pureza) y metanol grado LC/MS (99.9% de pureza) fueron obtenidos de Fisher Scientific (New York, USA). El agua ultrapura desionizada ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) se obtuvo mediante un sistema Milli-Q (Millipore, USA).

5.4.2. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

El diseño unifactorial fue utilizado en la extracción asistida por ultrasonido (EAU) para explorar y evaluar los efectos de la concentración de etanol (10–90%, v/v), la temperatura (30–75 °C) y el tiempo de extracción (10–50 min) sobre el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en la muestra de ulluco morado. La selección de estas variables y sus respectivos rangos se basó en estudios previos centrados en la extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices alimentarias y vegetales [43,76–78]

El procedimiento de extracción se adaptó del método descrito por Xia et al. [79], con ligeras modificaciones. En resumen, se pesaron 0.2000 g de muestra de ulluco en un tubo de vidrio con tapa, al cual se añadieron 10 mL de etanol (50 %, v/v). El tubo de vidrio tapado se colocó en un baño ultrasónico (Modelo UC-30A, Ultrasonic Cleaner Single Frequency Type, Biobase Scientific) bajo las condiciones optimizadas de extracción: etanol 50 % (v/v), 55 °C y 30 min de sonicación. Tras la sonicación, los extractos se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se transfirieron 5 mL del sobrenadante a un vaso de precipitados de vidrio de 50 mL y se concentraron a 37 °C durante 1 hora en un baño de agua termostatizado. El residuo resultante se reconstituyó con agua desionizada y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL para su posterior análisis por espectrofotometría UV/Vis y UHPLC-ESI-MS/MS.

5.4.3. Métodos espectrofotométricos UV/Vis: Folin-Cicalteu y FRAP

Las longitudes de onda de máxima absorción de los complejos coloreados correspondientes al contenido fenólico total (CFT) y a la actividad antioxidante (AA) fueron determinadas mediante un espectrofotómetro (UNICAM UV/VIS Spectrometer UV4, Cambridge, UK) en el rango de 400–800 nm.

Los extractos obtenidos en la **Sección 5.4.2** (volumen final ajustado a 10 mL) fueron usados como soluciones stock para las determinaciones espectrofotométricas del CFT y de la AA. Cuando fue necesario, se realizaron diluciones adicionales para asegurar que los valores de absorbancia se mantuvieran dentro del rango lineal de las respectivas curvas de calibración.

Para el ensayo Folin-Ciocalteu, 1 mL de la solución stock fue usado en la mezcla de reacción. Para el ensayo FRAP, 3 mL de la solución stock fueron transferidos a un matraz volumétrico de 5 mL y ajustados a volumen con agua desionizada. De esta dilución, se tomaron 150 µL para el ensayo FRAP.

Todas las mediciones se realizaron utilizando una cubeta de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm.

5.4.3.1. Método Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico total (CFT) se determinó de la siguiente manera: La mezcla de reacción fue preparada combinando 1 mL del extracto diluido o solución estándar, 2 mL de agua desionizada y 1 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu (10%, v/v) en un matraz aforado de 10 mL. Después de 5 minutos, 1 mL de la solución de carbonato de sodio (20%, p/v) fue adicionado, y el volumen fue ajustado a 10 mL con agua desionizada. Seguidamente, la mezcla fue incubada en un baño de agua termostatizado a 25 °C durante 1 hora, y la absorbancia fue medida a 700 nm.

El CFT fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) / 100 g de muestra seca (DW, dry weight).

5.4.3.2. Método FRAP para la determinación de la actividad antioxidante

El ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay) fue realizado de acuerdo con el método descrito por Thaipong et al. [80] con ligeras modificaciones. El reactivo FRAP se preparó mezclando buffer de acetato de sodio 300 mM (pH 3.6), solución de TPTZ 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM y solución de cloruro férrico 20 mM, en una proporción volumétrica 10:1:1 (v/v/v). El reactivo FRAP se preparó el mismo día del análisis y se mantuvo en oscuridad a 35 °C antes de su uso.

Para el análisis, a 150 µL del extracto diluido o de la solución estándar se adicionaron 2850 µL del reactivo FRAP en un tubo de vidrio con tapa. Seguidamente, la mezcla fue incubada en un baño de agua termostatizado a 35 °C durante 30 minutos, y la absorbancia fue medida a 597 nm. El blanco fue preparado y analizado en las mismas condiciones. La actividad antioxidante se expresó como mg de equivalentes de Trolox (mg ET)/100 g de muestra seca (DW, dry weight).

5.4.3.3. Parámetros analíticos de los métodos espectrofotométricos

Los parámetros analíticos, incluyendo la linealidad, los límites de detección (LOD), los límites de cuantificación (LOQ), la precisión y la exactitud, se evaluaron siguiendo las directrices establecidas por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH Q2(R1)) para garantizar la confiabilidad y la calidad del método analítico [81]. La linealidad fue evaluada mediante las curvas de calibración construidas a partir de nueve niveles de concentración de ácido gálico (10–140 mg/L) y Trolox (5–150 mg/L), preparadas a partir de soluciones estándar stock de 1000 mg/L y 500 mg/L, respectivamente. Los LODs y LOQs instrumentales se estimaron a partir del error estándar residual de la regresión ($S_{y/x}$) y de la pendiente (b) de la curva de calibración, utilizando las ecuaciones: $LOD = 3.3(S_{y/x})/b$ y $LOQ = 10(S_{y/x})/b$.

La precisión y la exactitud de los métodos se evaluaron con la muestra de ulluco morado bajo las condiciones óptimas de extracción. La precisión fue determinada en términos de repetibilidad (intra-día, un solo analista en el mismo día y laboratorio) y precisión intermedia (inter-día, un analista durante tres días no consecutivos en el mismo laboratorio), mediante la desviación estándar relativa (RSD, relative standard deviation). La exactitud fue evaluada mediante ensayos de recuperación, fortificando la muestra de ulluco morado con concentraciones conocidas de ácido gálico en tres niveles (20, 36 y 65 mg/g) para el método Folin-Ciocalteu y Trolox a tres niveles (2, 8 y 13 mg/g) para el método FRAP. Las recuperaciones se calcularon mediante la fórmula: $Recuperación (\%) = [(C_f - C_u)/C_a] \times 100$, donde C_u es la concentración de la matriz sin enriquecer (concentración original), C_f es la concentración de la matriz enriquecida y C_a es la concentración del analito adicionado.

5.4.4. UHPLC-ESI-MS/MS

5.4.4.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas

La determinación de compuestos fenólicos fue realizada usando un sistema UHPLC-ESI-MS/MS (UltiMate 3000 Series, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (DAD) ajustado a 210, 280, 320 y 360 nm, acoplado a un espectrómetro

de masas de triple cuadrupolo (TSQ Fortis, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) con una fuente de ionización electrospray (H-ESI, High-Electrospray Ionization).

La optimización de las condiciones cromatográficas se llevó a cabo utilizando una mezcla estándar de 13 compuestos fenólicos, con el objetivo de obtener una separación simultánea de los analitos investigados con resolución y forma de peak satisfactorios. La **Figura 5.2** muestra las estructuras químicas de los 13 compuestos fenólicos investigados en ulluco mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

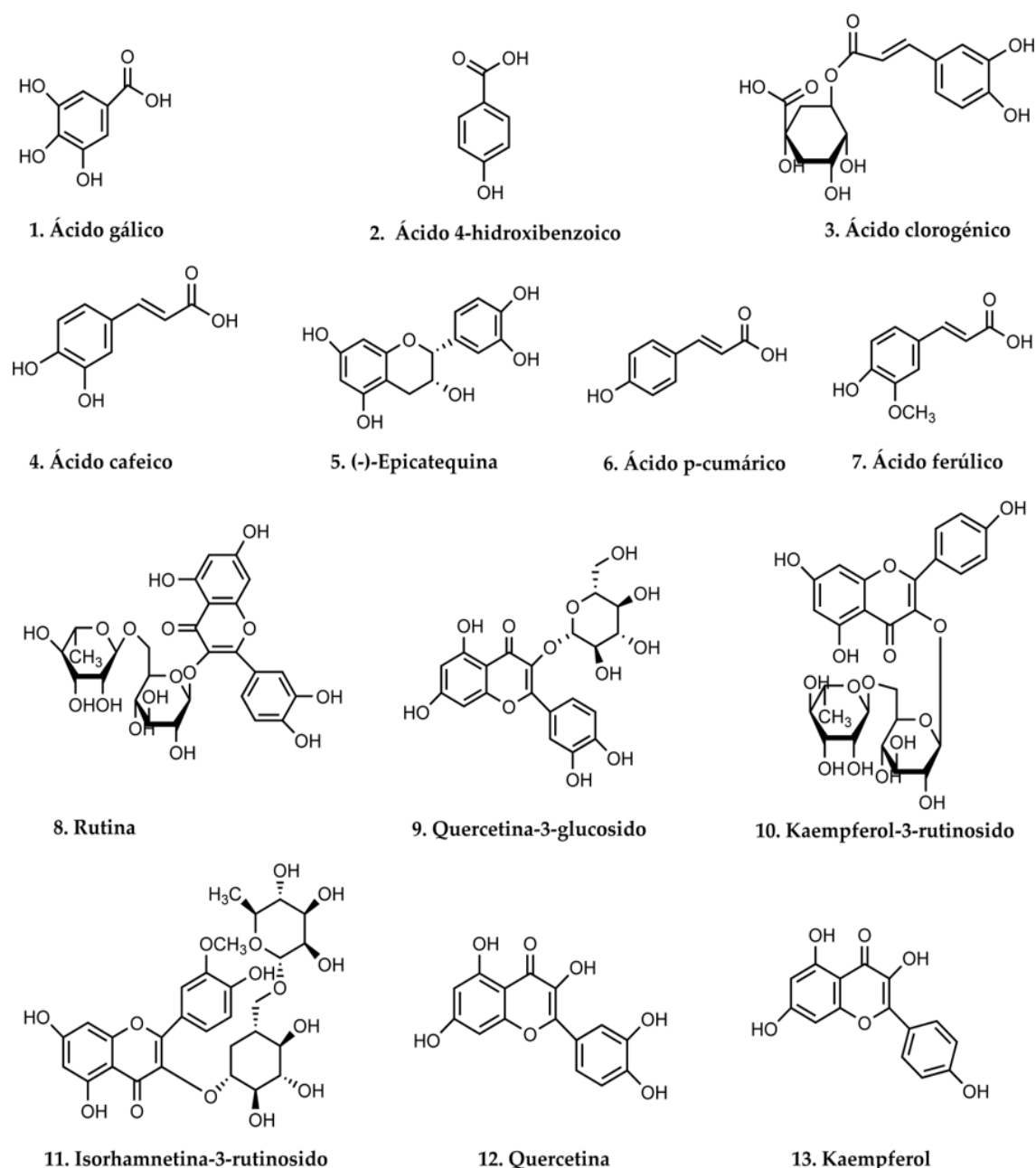


Figura 5.2 Estructuras químicas de 13 compuestos fenólicos investigados en cinco variedades de ulluco por UHPLC-ESI-MS/MS.

La separación se realizó en una columna Hypersil Gold™ C18 (1.9 μm , 50 mm $\times$ 2.1 mm d.i., Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 25 $^{\circ}\text{C}$. La fase móvil consistió en dos disolventes:

acetonitrilo (Solvente A) y agua ultrapura con 0.1 % de ácido fórmico (Solvente B). El programa de elución en gradiente, con un flujo de 0.3 mL/min, fue el siguiente: 0–1 min, 95–90 % B; 1–5 min, 90–88 % B; 5–18 min, 88–87 % B; 18–18.5 min, 87–60 % B; 18.5–24.5 min, 60–95 % B; 24.5–30 min, 95 % B. El volumen de inyección fue de 5 μ L para las muestras y las soluciones estándar.

El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo. Los parámetros de detección fueron los siguientes: voltaje de spray 2.5 kV; gas de nebulización 50 (Arb); gas auxiliar 10 (Arb); gas de barrido 1 (Arb); temperatura del tubo de transferencia 300 °C; temperatura del vaporizador 350 °C. El Q1 y Q3 fueron operados a una resolución de 1.2 FWHM. La presión del gas de disociación inducida por colisión (CID) se ajustó a 1.5 mTorr. Los experimentos preliminares fueron realizados en modo de barrido completo (Full scan) dentro de un rango de masas de 100 a 800 m/z para evaluar los iones precursores y optimizar las transiciones MS/MS. La cuantificación de los trece compuestos fenólicos se realizó en modo monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM, Selected Reaction Monitoring) a partir de las transiciones del ion precursor a producto obtenidas bajo energías de colisión previamente optimizadas. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el software Chromeleon™ 7, versión 7.2 SR5 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.).

5.4.4.2. Preparación de las soluciones estándar

Las soluciones estándar stock de 1.00 mg/mL fueron preparadas disolviendo cada compuesto estándar comercial en metanol. Las soluciones estándar de trabajo se prepararon mediante la dilución apropiada de las soluciones stock del analito en la fase móvil ACN: 0.1 % de ácido fórmico en agua (5:95, v/v). Todas las soluciones estándar y muestras fueron filtradas a través de una membrana de jeringa PTFE (0.22 μ m, 13 mm, Jet Biofil, Guangzhou, China) antes de su inyección en el sistema UHPLC-ESI-MS/MS.

5.4.4.3. Limpieza con extracción en fase sólida (SPE)

Los extractos fenólicos obtenidos mediante la EAU bajo condiciones optimizadas fueron purificados mediante extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction) para reducir interferencias de matriz, siguiendo el procedimiento descrito por Pereira et al. [82], con algunas modificaciones. El cartucho SPE (CEC08 Octyl, Endcapped, 500 mg, 3 mL, UCT, Bristol, PA, USA) fue activado con 3 mL de metanol y acondicionado con 3 mL de agua ultrapura.

Una alícuota de 2 mL del extracto fenólico se cargó en el cartucho. Seguidamente, el cartucho se lavó con 5 mL de agua ultrapura (no acidificada) para eliminar componentes de la matriz altamente polares. Luego, los compuestos fenólicos fueron eluidos con 5 mL de metanol (≥ 99.8 %, no acidificado). El eluato obtenido fue evaporado a sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo fue reconstituido en 1 mL de la fase móvil, centrifugado a 4000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, y filtrado previamente antes de su inyección en el sistema UHPLC-ESI-MS/MS. Asimismo, el tratamiento mediante SPE se implementó como medida de protección ante la ausencia de una columna de guarda en el sistema cromatográfico.

5.4.4.4. Parámetros analíticos del método cromatográfico

La linealidad, LODs, LOQs, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y la exactitud del método fueron evaluadas para detectar y cuantificar los compuestos fenólicos mediante

UHPLC-ESI-MS/MS. Para evaluar la linealidad, se empleó el método de calibración por estándar externo dentro del rango lineal, utilizando quince soluciones estándar mixtas que contenían trece compuestos fenólicos, preparadas a partir de las soluciones stock en un rango de concentraciones entre 1 y 3000 µg/L. Se utilizó un análisis de regresión lineal para determinar la pendiente, la intersección y el coeficiente de determinación de cada curva de calibración.

Para estimar los LODs y LOQs instrumentales, se construyó una curva de calibración a concentraciones bajas (1 a 200 µg/L). Con base en estas curvas de calibración para cada compuesto fenólico, los LODs y LOQs fueron calculados utilizando las ecuaciones indicadas en la **Sección 5.4.3.3**. Los LOQs fueron establecidos como la concentración más baja a la cual el método mostró linealidad.

La repetibilidad del método, incluyendo el procedimiento de EAU, limpieza con SPE-C8 y análisis cromatográfico, fue evaluada usando tres extractos independientes obtenidos de la muestra ulluco morado (U-1). Cada extracto fue inyectado en triplicado en el mismo día. La precisión intermedia del método fue evaluada mediante extractos preparados en tres días consecutivos, los cuales fueron inyectados en triplicado en el sistema cromatográfico. La variación fue presentada como RSD. La exactitud del método fue determinada mediante ensayos de recuperación, en los que se añadió una cantidad conocida de trece compuestos fenólicos a la muestra de ulluco morado (U-1) en tres niveles de concentración (40, 100 y 200 µg/g). La recuperación de cada compuesto fenólico se calculó utilizando la ecuación descrita en la **Sección 5.4.3.3**.

5.5. Determinación de carbohidratos no estructurales

5.5.1. Reactivos y soluciones estándar

Glucosa (≥ 99.5%), fructosa (≥ 99%), sacarosa (≥ 99.5%), ácido sulfúrico (95-97%), tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, hidróxido de sodio (> 99%), BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) + 1%TMCS (trimetilsilil), piridina, etanol (99.5%), hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado y sulfato de zinc heptahidratado, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Merck, Alemania); ramnosa hidratada, L (+) arabinosa y D (+) xilosa fueron obtenidos en BDH Chemical Laboratory (Inglaterra), acetonitrilo (ACN) Multi-solvent grado HPLC ACS UV-Vis; ácido 3,5-dinitrosalicílico (> 98%) de Fluka Chemika, gas nitrógeno 99.95%, agua desionizada ultrapura (18.2 MΩ cm-1) fue obtenida desde un sistema Milli-Q (Millipore, USA).

5.5.2. Extracción asistida por ultrasonido para carbohidratos

Para la extracción de carbohidratos solubles, se pesaron 0.2000 g de muestra liofilizada y molida en tubos de vidrio con tapa. Se adicionaron 10 mL de solvente extractor etanol/agua, de acuerdo con las condiciones definidas en la etapa de optimización. Las muestras fueron sometidas a extracción asistida por ultrasonido (Modelo UC-30A, Ultrasonic Cleaner Single Frequency Type, Biobase Scientific) y luego centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 5 mL del sobrenadante, los cuales fueron evaporados y reconstituidos con agua desionizada en un matraz aforado de 10 mL. Los extractos obtenidos fueron diluidos, cuando fue necesario, para asegurar que las respuestas analíticas se encontraran dentro del rango de trabajo de los métodos espectrofotométricos y cromatográficos.

5.5.3. Optimización mediante el diseño Box-Behnken

La optimización de la extracción de carbohidratos solubles se realizó utilizando inicialmente un diseño unifactorial para evaluar el efecto de la composición del solvente extractor, el tiempo de sonicación y la temperatura de extracción. A partir de estos resultados, se aplicó un diseño Box-Behnken basado en la metodología de superficie de respuesta, considerando como variable de respuesta el contenido de carbohidratos solubles totales de la variedad amarilla (U-4) determinado por el método fenol-sulfúrico. El modelo obtenido fue evaluado mediante análisis de varianza, coeficiente de determinación y prueba de falta de ajuste. Las condiciones óptimas predichas fueron verificadas experimentalmente mediante ensayos independientes.

5.5.4. Métodos espectrofotométricos UV/Vis para carbohidratos solubles

La longitud de onda de máxima absorbancia de los complejos coloreados correspondientes al contenido de carbohidratos solubles totales (CST) y azúcares reductores (AR) se determinó mediante los ensayos fenol-sulfúrico y DNSA usando un espectrofotómetro UV-Vis (UNICAM UV/VIS Spectrometer UV4) en el rango de 400–800 nm.

Adicionalmente, se evaluó de manera preliminar el efecto de la clarificación con reactivo de Carrez sobre la determinación espectrofotométrica de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores. Para ello, extractos de las variedades seleccionadas fueron tratados con reactivos de Carrez I y II, y posteriormente analizados mediante los métodos fenol-sulfúrico y DNSA. Los resultados obtenidos fueron comparados con extractos no tratados, con el fin de evaluar la posible influencia de compuestos interferentes presentes en la matriz.

5.5.4.1. Método fenol-sulfúrico para carbohidratos solubles totales

El contenido de carbohidratos solubles totales (CST) fue determinado mediante el método de fenol-sulfúrico. La reacción colorimétrica se realizó bajo campana extractora, mezclando las siguientes soluciones: A 0.5 mL de la solución estándar de glucosa o de la dilución de muestra se adicionaron 0.5 mL de fenol al 5 % (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Seguidamente, la mezcla se agitó por 20 s y se llevó a un baño termostatzado a 25 °C por 1 hora. La lectura de absorbancia fue medida a 490 nm. Los resultados fueron expresados como gramos equivalentes de glucosa (g EG)/100 g DW (Dry weight, peso seco).

5.5.4.2. Método DNSA para azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores (AR) se determinó utilizando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA). El reactivo se preparó disolviendo 2.5 g de DNSA y 75 g de tartrato de sodio-potasio en solución de NaOH 0.5 N a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se realizó mezclando las siguientes soluciones y reactivos bajo una campana extractora: A 3 mL de solución estándar de glucosa o dilución de muestra contenidos en un tubo de vidrio con tapa se agregó 1 mL de reactivo DNSA. Seguidamente, los tubos fueron colocados en un baño de agua hasta la ebullición durante 5 minutos, enfriados en un baño de hielo y posteriormente colocados en un baño de agua termostatzado a 25 °C durante 1 h. La absorbancia fue medida a 540 nm. Los resultados fueron expresados como gramos equivalentes de glucosa (g EG)/100 g DW.

5.5.4.3. Parámetros analíticos de los métodos espectrofotométricos

La linealidad fue evaluada mediante soluciones estándar de glucosa preparadas en distintos niveles de concentración, incluyendo un blanco de reactivos: para el método fenol-

sulfúrico (entre 0-160 mg/L de glucosa) y para DNSA (entre 0 – 400 mg/L de glucosa), preparadas a partir de soluciones estándar stock de glucosa de 1000 mg/L y 500 mg/L. El rango de trabajo se estableció a partir de los niveles que cumplieron criterios adecuados de linealidad y respuesta analítica. Los LODs y LOQs instrumentales para cada método fueron estimados a partir del error típico ($S_{y/x}$) de la regresión y la pendiente (b) de la curva de calibración, utilizando las ecuaciones: $LOD = 3.3(S_{y/x})/b$ y $LOQ = 10(S_{y/x})/b$.

La precisión y la exactitud de los métodos se evaluaron con la muestra ulluco amarillo (U-4) bajo las condiciones óptimas de extracción. La precisión fue determinada en términos de repetibilidad (un solo analista en el mismo día y laboratorio) y precisión intermedia (un analista durante tres días no consecutivos en el mismo laboratorio), mediante la desviación estándar relativa (RSD, relative standard deviation). La exactitud fue evaluada mediante ensayos de recuperación, fortificando la muestra de ulluco amarillo (U-4) con concentraciones conocidas de glucosa en dos niveles de concentración para los métodos fenol-sulfúrico y DNSA. Las recuperaciones se calcularon mediante la fórmula: $Recuperación (\%) = [(C_f - C_u)/C_a] \times 100$, donde C_u es la concentración de la matriz sin enriquecer (concentración original), C_f es la concentración de la matriz enriquecida y C_a es la concentración del analito adicionado.

5.5.5. HPLC-ELSD

5.5.5.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Las muestras fueron analizadas en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con un desgasificador Desgasex™ modelo DG-440 (Phenomenex), una bomba cuaternaria YL 9110 Plus+ y un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD 2424, Waters). La separación simultánea de glucosa, fructosa, sacarosa, ramnosa, arabinosa y xilosa se realizó utilizando una columna Inertsil NH₂ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) a una temperatura de 25 °C. La fase móvil consistió en acetonitrilo: agua (85:15, v/v) en modo isocrático y un flujo de 1 mL/min. Se inyectó manualmente un volumen de 20 μL de cada solución estándar o extracto de muestra para todos los análisis.

En cuanto al sistema de detección ELSD, los parámetros de operación fueron a un Gain de 70, presión del gas de nebulización (N₂) de 40 psi y la temperatura del tubo de deriva fue ajustada a 60 °C. Este detector puede presentar una respuesta no estrictamente lineal debido a que la señal que produce depende directamente del tamaño de las partículas del analito tras evaporar el disolvente.

5.5.5.2. Preparación de las soluciones estándar

Las soluciones estándar stock de 10000 mg/L de cada azúcar fueron preparadas disolviendo cada compuesto estándar comercial en agua ultrapura y almacenadas a 4 °C. Las soluciones estándar de trabajo se prepararon mediante la dilución apropiada de las soluciones stock del analito en la fase móvil ACN: agua (85:15, v/v). Todas las soluciones estándar y muestras fueron filtradas a través de una membrana de jeringa PTFE (0.22 μm, 13 mm, Jet Biofil, Guangzhou, China) antes de su inyección en el sistema HPLC-ELSD.

5.5.5.3. Parámetros analíticos del método cromatográfico

La linealidad, LODs, LOQs, precisión y exactitud del método fueron evaluadas para la determinación de azúcares solubles por HPLC-ELSD. Para la evaluación de la linealidad, se

empleó calibración por estándar externo utilizando soluciones estándar de trabajo de ramnosa, xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa y sacarosa, preparadas a partir de las soluciones stock en el rango de concentración de 50 a 700 mg/L. Las curvas de calibración se construyeron a partir de la relación entre la señal cromatográfica y la concentración de cada azúcar. Considerando la naturaleza del detector ELSD, la adecuación del modelo de calibración deberá ser verificada para cada analito.

Los LODs y LOQs fueron estimados a partir de las curvas de calibración de baja concentración, utilizando los criterios definidos para los métodos cromatográficos. La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia, considerando el procedimiento de extracción y el análisis cromatográfico. La repetibilidad se determinó mediante extractos independientes de la muestra seleccionada para validación, inyectados en triplicado el mismo día. La precisión intermedia se evaluó mediante extractos preparados y analizados en diferentes días. La exactitud se evaluó mediante ensayos de recuperación, fortificando la muestra de ulluco amarillo (U-4) con concentraciones conocidas de los azúcares evaluados.

5.5.6. Identificación de carbohidratos por GC/MS

Para el análisis cualitativo de carbohidratos por GC/MS, se extrajeron de 0.1 g de muestra liofilizada y molida con 2 mL de metanol mediante ultrasonido durante 20 minutos. Posteriormente, los extractos fueron centrifugados y filtrados a través de membranas PTFE de 0.22 μm antes del proceso de derivatización. Esta etapa tuvo como finalidad obtener una fracción soluble adecuada para la identificación cualitativa de azúcares mediante GC/MS. Las condiciones instrumentales y el método de derivatización se realizaron con ligeras modificaciones del procedimiento descrito por Choi et al.[83]. Las muestras fueron analizadas en modo split (100:1) en un sistema GC/MS de tipo cuadrupolo (HP 6890 Series Gas Chromatograph y HP 5973 Mass Selective Detector), equipado con una columna capilar de 29.9 m (HP 5MS, 250 μm ID, 0.50 μm , Agilent). La temperatura del inyector fue de 250 °C, la de la línea de transferencia del MSD de 280 °C, y la de la fuente de iones de 230 °C. El gas portador fue helio, con flujo constante de 1 mL/min. El programa de temperatura consistió en una temperatura inicial de 65 °C durante 2 min, seguida de un incremento de 6 °C/min hasta 300 °C, manteniendo esta última durante 15 min. Los parámetros de adquisición del espectrómetro de masas fueron: modo de barrido (scan) con rango m/z 20–650 y ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV.

La identificación cualitativa de azúcares solubles se realizó previa derivatización de los extractos con 10 μL de piridina y 25 μL de BSTFA + 1% TMCS a 70 °C durante 2 horas, con el fin de aumentar la volatilidad y estabilidad térmica de los carbohidratos. Se inyectaron manualmente volúmenes de 1 μL de muestra o solución estándar. La identificación se basó en la comparación de tiempos de retención, espectros de masas de estándares comerciales y patrones de fragmentación reportados en la literatura.

5.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedio $\pm$ desviación estándar ($\bar{x} \pm s$) de réplicas independientes. Las diferencias significativas entre variedades fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Duncan, con un nivel de

significancia de $p < 0.05$. Para la optimización de la extracción de carbohidratos solubles totales se utilizó metodología de superficie de respuesta mediante diseño Box-Behnken, evaluando la significancia del modelo, los efectos principales, las interacciones y la falta de ajuste. Para los compuestos fenólicos, se aplicaron análisis de correlación de Pearson y análisis de componentes principales, según correspondiera. Los datos fueron procesados usando Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics (Versión 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) y RStudio (Versión 2025.09.0+38). El diseño Box-Behnken, el análisis de superficie de respuesta y los gráficos de contorno fueron generados utilizando Design-Expert y Stat-Ease.360 (Versión 22.0, Minneapolis, MN, USA).

6. Capítulo: Resultados y Discusión

6.1. Objetivo específico 1: Análisis proximal de cinco variedades de ulluco

Los resultados del análisis proximal de las cinco variedades de ulluco se muestran en la **Tabla 6.1**. El agua es el componente mayoritario de las muestras de ulluco; el porcentaje de humedad osciló entre 72 y 89% en peso fresco. Este parámetro puede tener un efecto significativo en el tamaño, el peso, la textura y la apariencia de los tubérculos. Resultados similares fueron obtenidos por Buch et al. [12] y Pacheco et al. [13] en otras variedades de ulluco.

El porcentaje de proteína se encontró entre 10 % y 12% en peso seco. Estos valores son comparables con los resultados reportados por Espin et al. [7]. En otro estudio, Pacheco et al. [13] indicaron que la variedad amarilla-rosa presentó 13 % de proteína, más alto que el yacon, la mashua, la batata morada y la zanahoria blanca.

Tabla 6.1 Análisis proximal de cinco variedades de *Ullucus tuberosus*.

N°	Parámetros	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
1	Humedad (% FW)	72 $\pm$ 1	86 $\pm$ 1	89.9 $\pm$ 0.3	84.8 $\pm$ 0.1	87.9 $\pm$ 0.3
2	Cenizas (% DW)	6.4 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.4	6.91 $\pm$ 0.03	6.3 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.3
3	Proteínas (%DW)	12 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
4	Sodio (mg/100 g DW)	17 $\pm$ 1	11.4 $\pm$ 0.3	9.9 $\pm$ 0.4	15 $\pm$ 1	9.4 $\pm$ 0.4
5	Potasio (mg/100 g DW)	2084 $\pm$ 4	2077 $\pm$ 7	2411 $\pm$ 28	2347 $\pm$ 16	2286 $\pm$ 21
6	Calcio (mg/100 g DW)	20 $\pm$ 1	18 $\pm$ 3	21.5 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1
7	Magnesio (mg/100 g DW)	99 $\pm$ 3	96 $\pm$ 9	109 $\pm$ 2	115 $\pm$ 5	99.7 $\pm$ 0.2
8	Hierro (mg/100 g DW)	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	6.5 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 0.4	6.6 $\pm$ 0.1
9	Zinc (mg/100 g DW)	2.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.1
10	Cobre (mg/100 g DW)	1.0 $\pm$ 0.1	0.89 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.1	1.06 $\pm$ 0.03	1.32 $\pm$ 0.04

Los resultados están expresados en peso seco liofilizado, excepto para el parámetro humedad que está expresado en peso fresco; U-1: Ulluco morado; U-2: Ulluco morado-naranja; U-3: Ulluco naranja-amarillo; U-4: Ulluco amarillo; U-5: Ulluco amarillo-verde; DW: Dry weight (peso seco); FW: Fresh weight (peso fresco)

El contenido de ceniza osciló entre 6.2 y 6.91 % en base seca en las cinco variedades analizadas. Estos valores son mayores que los contenidos de ceniza reportados para otros tubérculos andinos, como la papa, oca, yuca y mashua, lo que podría indicar que las variedades de ulluco tienen un mayor contenido de minerales esenciales.

El potasio fue el mineral más abundante en las cinco variedades de ulluco, seguido por el magnesio, calcio, sodio, hierro, zinc y cobre. Se ha descrito que el potasio está involucrado en

muchos procesos fisiológicos del tubérculo y que una deficiencia de este mineral puede conducir a la acumulación de compuestos de bajo peso molecular, y disminución de la síntesis de compuestos de alto peso molecular, como proteínas y almidones [84].

El contenido de Na, K, Ca, Mg y Fe de las cinco variedades de ulluco analizadas en este trabajo fue mayor que el del ulluco amarillo-rosa investigado por Pacheco et al. [13]. El ulluco morado presentó el mayor contenido de hierro entre las variedades analizadas. El calcio y el magnesio contribuyen a la estabilización y las funciones de la pared celular en cultivos de tubérculos [84], y el hierro es fundamental para el proceso de fotosíntesis de la planta del tubérculo, garantizando la producción de azúcares y almidones [85]. Estos minerales cumplen funciones nutricionales relevantes; sin embargo, sus niveles en el tubérculo dependen principalmente de factores edafológicos, condiciones de cultivo y características propias de cada variedad. Estudios previos de análisis proximal de tubérculos de ulluco han descrito contenidos de humedad, cenizas, materia seca, proteínas y minerales similares a los valores reportados en este trabajo.

El análisis proximal permitió establecer una caracterización composicional inicial de las cinco variedades de ulluco, observándose perfiles relativamente similares en términos de cenizas, proteínas y contenido mineral. Si bien se registraron variaciones puntuales entre muestras, estas no evidencian diferencias marcadas en la composición proximal general. Por lo tanto, estos resultados proporcionan una base descriptiva para contextualizar la matriz de estudio y apoyar la interpretación posterior de los compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales determinados en las mismas variedades.

6.2. Objetivo específico 2: Determinación espectrofotométrica del contenido fenólico total y de la actividad antioxidante.

El diseño unifactorial permitió optimizar de forma sistemática la extracción asistida por ultrasonido (EAU) de un alimento poco explorado, como *Ullucus tuberosus*. Los efectos de la concentración de etanol, la temperatura de extracción y el tiempo de sonicación sobre el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA) en la muestra de ulluco morado se ilustran en la **Figura 6.1 (a–c)**. Los resultados del ANOVA demostraron que los tres factores evaluados tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre el CFT y la AA.

6.2.1. Concentración de etanol

Las concentraciones de etanol en el rango de 10 a 90% (v/v) fueron evaluadas a una temperatura de extracción fija de 30 °C y un tiempo de sonicación de 30 minutos. Como se muestra en la **Figura 6.1 a**, concentraciones elevadas de etanol disminuyeron el rendimiento de extracción de CFT, obteniéndose rendimientos de extracción entre 337 ± 13 y 707 ± 8 mg EAG/100 g DW, mientras que los valores de la AA oscilaron entre 316 ± 17 y 873 ± 12 mg ET/100 g DW, observándose los valores más bajos con etanol al 90% (v/v). El uso de mezclas hidroalcohólicas favoreció la recuperación de compuestos fenólicos de polaridad media y alta, como ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, que presentan actividad antioxidante y son más solubles en disolventes acuosos. La presencia de agua modifica la polaridad del etanol, mejorando así su eficiencia de extracción [86].

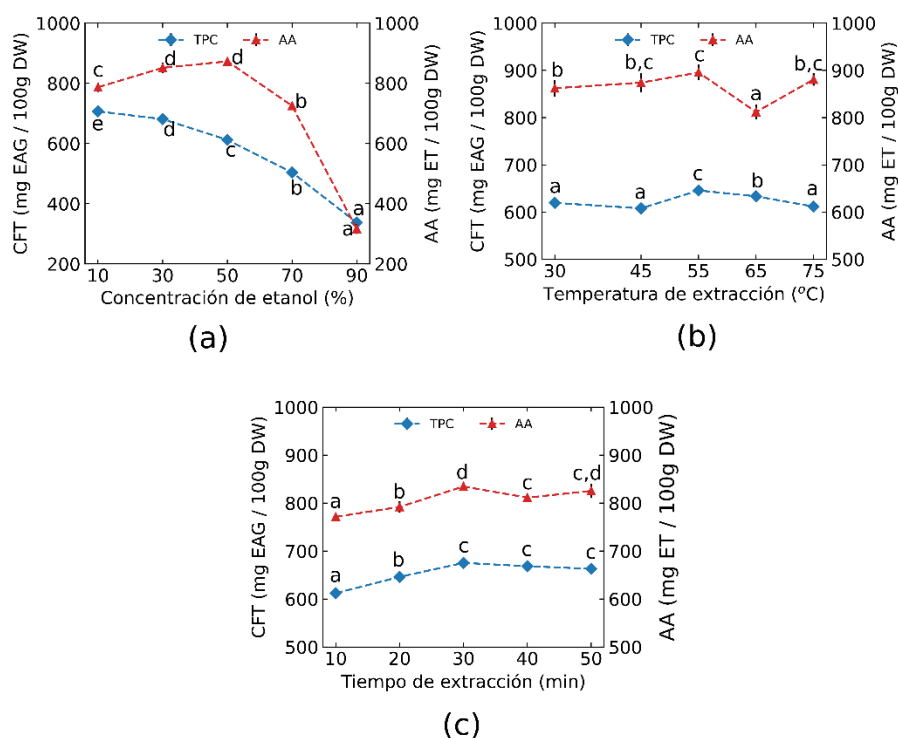


Figura 6.1 Experimento unifactorial para la extracción asistida por ultrasonido (EAU): (a) Efecto de la concentración de etanol, (b) temperatura de extracción y (c) tiempo de extracción sobre el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA) en el ulluco morado (U-1). Letras diferentes dentro del mismo grupo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los promedios, según lo determinado por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Con base en estos resultados, se seleccionó una concentración de etanol del 50% para las extracciones posteriores, debido a que se obtuvo el valor más alto de actividad antioxidante (873 ± 12 mg ET/100 g DW) y se mantuvo un valor elevado del contenido fenólico total (612 ± 6 mg EAG/100 g DW). Además, la concentración de etanol seleccionada reduce la coextracción de compuestos interferentes altamente polares. Estos hallazgos son consistentes con reportes previos que indican que concentraciones de etanol entre 50% y 60% son óptimas para la extracción de compuestos fenólicos en otras matrices alimentarias [86–89].

6.2.2. Temperatura de extracción

La temperatura es un factor crítico en la extracción de compuestos fenólicos, ya que reduce la viscosidad del solvente, aumenta la velocidad de movimiento molecular y mejora la transferencia de masa, optimizando así el rendimiento de la extracción asistida por ultrasonido [90]. El efecto de la temperatura se evaluó en el rango de 30 °C a 75 °C utilizando 50% de etanol-agua y un tiempo de sonicación constante de 30 min. Como se muestra en la **Figura 6.1 b**, los valores de CFT oscilaron entre 608 ± 6 y 646 ± 11 mg EAG/100 g DW, mientras que los valores de AA oscilaron entre 812 ± 15 y 896 ± 16 mg ET/100 g DW. El valor más alto tanto de CFT como de la AA se obtuvo a 55 °C. Por lo tanto, se eligió 55 °C como la temperatura óptima de extracción. A temperaturas superiores al valor óptimo, se observó una disminución tanto del CFT como de la AA, posiblemente debido a la degradación térmica de compuestos fenólicos termolábiles. En otros estudios se han reportado temperaturas similares como óptimas para la extracción de compuestos fenólicos y la determinación de su actividad antioxidante [90,91].

6.2.3. Tiempo de sonicación

El tiempo de sonicación afecta directamente la eficiencia y el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos, así como también la actividad antioxidante resultante [92]. En este método de extracción, se evaluó el efecto del tiempo de sonicación (10 a 50 minutos) sobre el CFT y AA, empleando etanol al 50% a una temperatura de extracción fija de 55 °C. Como se muestra en la **Figura 6.1 c**, los valores de ambos CFT y AA aumentan en el rango de 10 a 30 min de sonicación, alcanzando valores máximos a los 30 min, nominalmente 675 ± 8 mg EAG/100 g DW y 835 ± 8 mg ET/100 g DW para el CFT y la AA, respectivamente. Por encima de este tiempo de sonicación, se observó una disminución tanto del CFT como de la AA, probablemente debido a la degradación de compuestos fenólicos termolábiles causada por la exposición prolongada a la sonicación o a la acumulación de calor. Estas observaciones concuerdan con informes previos que indican que tiempos de sonicación entre 20 y 30 min producen rendimientos de extracción óptimos de compuestos fenólicos en matrices alimentarias [93–95].

Basados en estos resultados, una concentración de etanol/agua 50 % (v/v), temperatura de extracción de 55 °C y un tiempo de sonicación de 30 minutos fueron establecidos como las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante en muestras de ulluco. Similares condiciones de extracción han sido reportadas para matrices alimentarias utilizando métodos de superficie de respuesta [96].

6.2.4. Validación del método Folin-Ciocalteu y FRAP

Se evaluaron los parámetros analíticos de los métodos espectrofotométricos Folin-Ciocalteu y FRAP aplicados para determinar el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA), respectivamente. En la **Figura 6.2** se presentan los espectros de absorción y las curvas de calibración correspondientes a los métodos espectrofotométricos Folin-Ciocalteu y FRAP.

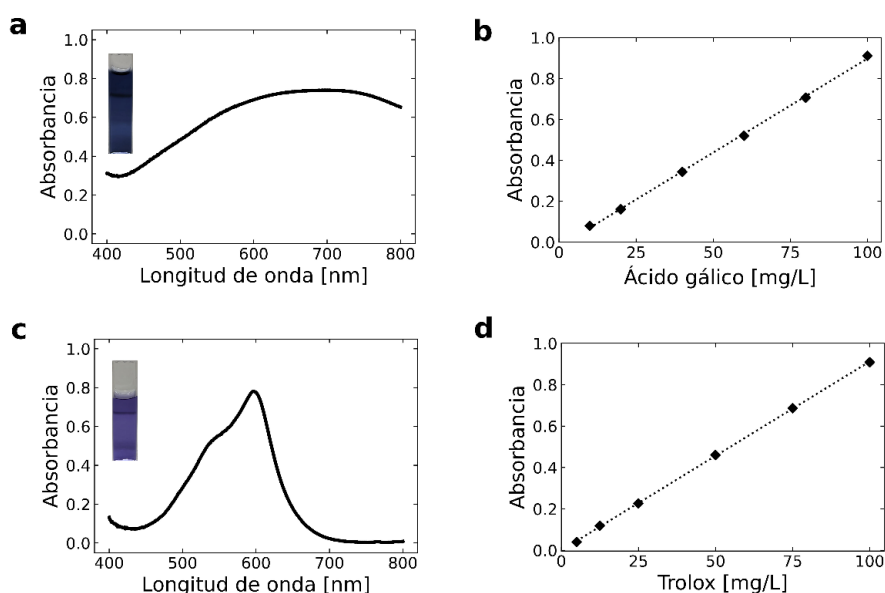


Figura 6.2 Espectro de absorción UV/Vis (400-800 nm) y curvas de calibración de los métodos espectrofotométricos: (a, b) Contenido fenólico total (CFT) usando el método Folin-Ciocalteu y (c, d) actividad antioxidante usando el método FRAP.

Inicialmente, se realizó un escaneo espectral entre 400 y 800 nm para seleccionar las longitudes de onda. La absorbancia máxima del complejo Folin-Ciocalteu fue observada entre 650 y 724 nm y se seleccionó 700 nm como la longitud de onda óptima bajo las condiciones experimentales establecidas. Esta longitud de onda se encuentra dentro del rango reportado (615 – 765 nm) para el CFT con el reactivo Folin-Ciocalteu. La longitud de onda óptima puede variar dependiendo del compuesto de referencia utilizado para la cuantificación, la matriz analizada, la instrumentación y las condiciones experimentales [90,91]. Diversos estudios respaldan el uso de longitudes de onda alternativas a la comúnmente reportada 765 nm. Por ejemplo, el CFT ha sido determinado a 700 nm en extractos de mangostán y semillas de uva [91], a 650 nm en especies de Lamiaceae [97], y a 630 nm en cáscaras de cítricos y otros materiales vegetales [98]. Estas observaciones resaltan la importancia de realizar un escaneo preliminar de la longitud de onda del complejo coloreado para cada matriz específica bajo las condiciones de análisis empleadas.

Para el ensayo FRAP, la absorción máxima del complejo Fe^{2+} - TPTZ se observó a 597 nm (**Figura 6.2 c**), la cual es consistente con el valor comúnmente reportado de 593 nm [49,99,100]. Las curvas de calibración se construyeron graficando las absorbancias frente a los niveles de concentración de soluciones estándar de ácido gálico y de Trolox, como se muestra en la **Figura 6.2 b, d**. Los resultados de linealidad, los límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs) instrumentales, la repetibilidad, la precisión intermedia y la recuperación se resumen en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2 Parámetros analíticos de los métodos espectrofotométricos para la determinación del contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA) en ulluco.

Parámetros analíticos	Método Folin-Ciocalteu	Método FRAP
Rango lineal (mg/L)	LOQ – 100	LOQ – 100
Ecuaciones de calibración	$y = 0.0096x - 0.0183$	$y = 0.0091x + 0.0002$
R^2	0.9994	0.9998
LOD (mg/L)	3	2
LOQ (mg/L)	10	5
Repetibilidad (RSD, n = 9)	2%	2%
Precisión intermedia (RSD, n = 9)	4%	8%
% Recuperación (n = 3)		
Baja	112%	92%
Media	109%	98%
Alta	110%	98%

Las curvas de calibración se prepararon mediante dilución de las soluciones stock de ácido gálico y de Trolox para la determinación de CFT y de AA, respectivamente; LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación; R^2 : Coeficiente de determinación. La precisión fue expresada en términos de repetibilidad (un analista, en el mismo día en un mismo laboratorio) y precisión intermedia (un analista, en diferentes días en el mismo laboratorio). La exactitud fue reportada como porcentaje de recuperación, enriqueciendo la muestra de ulluco morado con cantidades conocidas de ácido gálico y Trolox a tres niveles de concentración (20, 36 y 65 mg/g) y (2, 8 y 13 mg/g) para CFT y AA, respectivamente; RSD: Relative Standard Deviation

El ANOVA confirmó que los modelos lineales de calibración fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en los rangos de concentración de 10 – 100 mg EAG/L para CFT y de 5 –

100 mg ET/L para la AA. Estos rangos de concentración son consistentes con los reportados en estudios previos que emplean soluciones estándar de ácido gálico y Trolox para la cuantificación de CFT y la AA [49,90,101,102].

Los coeficientes de determinación ($R^2 > 0.9994$) indican una adecuada linealidad en los rangos evaluados, junto con límites de detección y cuantificación suficientemente bajos para la aplicación de los métodos en extractos de ulluco.

La repetibilidad y la precisión intermedia mostraron valores de RSDs menores al 8%, los cuales se encuentran dentro del rango aceptable (<10%) establecido para los métodos espectrofotométricos [90].

Se realizaron experimentos de recuperación a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), cada uno analizado en triplicado ($n = 9$). Los valores medios de recuperación oscilaron entre 109% y 112% para el CFT y entre 92% y 98% para el FRAP, lo que indica un porcentaje de recuperación satisfactorio en las condiciones experimentales propuestas. Los valores de recuperación ligeramente elevados para el CFT son similares a los reportados en otras investigaciones en matrices vegetales complejas, donde otras sustancias reductoras pueden contribuir a la señal medida [103,104].

Los resultados obtenidos demuestran que los métodos espectrofotométricos Folin-Ciocalteu y FRAP presentan linealidad, precisión y recuperación adecuadas para la determinación del contenido fenólico total y de la actividad antioxidante en extractos de *Ullucus tuberosus*. Estos antecedentes respaldan su aplicación como métodos complementarios para la caracterización global de los compuestos fenólicos en las variedades analizadas.

6.2.5. Resultados del contenido fenólico total y la actividad antioxidante en las cinco variedades de ulluco

Se aplicaron los métodos espectrofotométricos para determinar el CFT y la AA en las cinco variedades de ulluco bajo las condiciones optimizadas de EAU. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 6.3**.

Tabla 6.3 Contenido fenólico total (CFT) y actividad antioxidante (AA) de cinco variedades de *Ullucus tuberosus*.

Muestra	Variedad de ulluco	CFT	AA
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
U-1	Morado	681 ± 9^d	992 ± 6^c
U-2	Morado-naranja	625 ± 5^b	1017 ± 21^d
U-3	Naranja-amarillo	645 ± 13^c	1126 ± 9^e
U-4	Amarillo	456 ± 8^a	698 ± 9^a
U-5	Amarillo-verde	612 ± 13^b	963 ± 8^b

CFT: mg EAG/100 g DW; AA: mg ET/100 g DW; s: Desviación estándar; Valores con diferentes letras dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba de Duncan.

El ANOVA y la prueba del rango múltiple de Duncan indicaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las variedades analizadas para CFT y AA. Estas diferencias podrían estar influenciadas por las variaciones en la composición fenólica de las muestras. La variedad morada presentó el valor más alto de contenido fenólico, mientras que la variedad amarilla (U-4) mostró valores bajos de CFT y AA en comparación con las otras variedades de ulluco investigadas que exhiben colores de piel mixtos con diferentes intensidades de pigmentación. La actividad antioxidante siguió el siguiente orden: naranja-amarillo > morado-naranja > morado > amarillo-verde > amarillo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las variedades con coloración morada, naranja o mixta presentaron, en general, mayores valores de CFT y AA que la variedad amarilla (U-4). Esta tendencia sugiere una posible relación entre la pigmentación del tubérculo y el contenido de fenólicos; sin embargo, el color no debe interpretarse como un indicador directo de la actividad antioxidante, debido a que otros componentes de la matriz, como las betalainas, también pueden contribuir a la pigmentación y a la respuesta observada. En una investigación realizada por Muñoz et al. [105] reportaron que las cáscaras del ulluco rojo y amarillo presentan mayor contenido de compuestos fenólicos y de actividad antioxidante que sus pulpas correspondientes, lo que respalda la importancia de considerar la distribución de estos compuestos en los tejidos del tubérculo.

Los valores del CFT obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Pacheco et al. [13] para el ulluco rosa-amarillo y otros tubérculos andinos, como la papa morada y la zanahoria blanca. Las diferencias en el solvente de extracción, la temperatura y el tiempo de extracción, así como las características del tubérculo podrían explicar parcialmente estas discrepancias. De manera similar, Pérez-Balladares et al. [20] reportaron valores más bajos de CFT y de AA para el ulluco, obtenidos mediante extracción metanólica y expresados en base al peso fresco. No obstante, estos antecedentes permiten contextualizar los valores obtenidos y respaldan el interés de estudiar el perfil fenólico del ulluco mediante estrategias analíticas complementarias.

6.3. Objetivo específico 3: Determinación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS

6.3.1. Separación simultánea de 13 compuestos fenólicos

La alta selectividad y sensibilidad del sistema UHPLC-ESI-MS/MS permiten la separación y detección de los analitos con una resolución satisfactoria en un tiempo de análisis relativamente corto. Sin embargo, se requiere una optimización cuidadosa de las condiciones cromatográficas y de los parámetros de detección (DAD y MS/MS) para evitar la coelución de analitos estructuralmente relacionados. Las condiciones cromatográficas y de detección optimizadas se describen en la **Sección 5.4.4**.

La **Figura 6.3** muestra los cromatogramas representativos de la separación simultánea de trece compuestos fenólicos investigados en cinco variedades de ulluco mediante UHPLC-ESI-MS/MS en modo full scan.

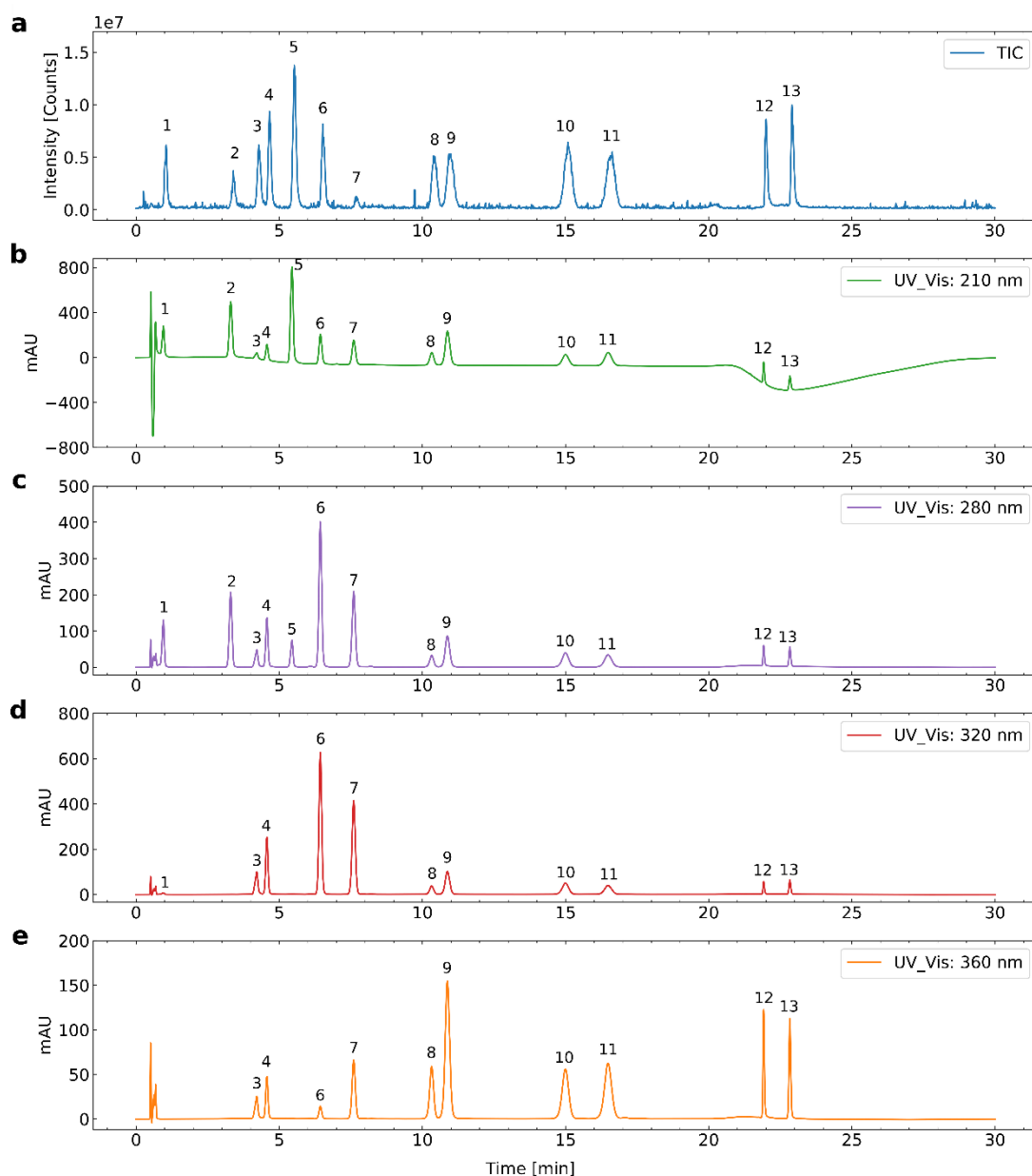


Figura 6.3 Separación simultánea de trece compuestos fenólicos mediante UHPLC-ESI-MS/MS en modo full scan, utilizando una columna Hypersil Gold™ C18 (1.9 μm , 50 mm x 2.1 mm d.i.). a) Cromatograma de iones totales (Total ion chromatogram, TIC). b - e) UV/Vis a 210, 280, 320 y 360 nm. (1) ácido gálico, (2) ácido 4-hidroxibenzoico, (3) ácido clorogénico, (4) ácido cafeico, (5) (-)-epicatequina, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido ferúlico, (8) rutina, (9) quercetina-3-glucósido, (10) kaempferol-3-rutinósido, (11) isorhamnetina-3-rutinósido, (12) quercetina y (13) kaempferol

Los trece compuestos fenólicos investigados en las variedades de ulluco fueron: (1) ácido gálico, (2) ácido 4-hidroxibenzoico, (3) ácido clorogénico, (4) ácido cafeico, (5) (-)-epicatequina, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido ferúlico, (8) rutina, (9) quercetina-3-glucósido, (10) kaempferol-3-rutinósido, (11) isorhamnetina-3-rutinósido, (12) quercetina y (13) kaempferol.

El rango de escaneo de masas (100 – 800 m/z) fue seleccionado en función de la literatura científica disponible, del análisis preliminar completo de los iones precursores y de los productos esperados de los trece compuestos fenólicos. Durante la optimización del método, ampliar el

rango de masas (m/z) más allá de 800 m/z resultó en un aumento del ruido de fondo y una reducción de la sensibilidad analítica. Por el contrario, limitar el rango de masas a 100-800 m/z mejoró la relación señal/ruido y la sensibilidad de detección para los compuestos fenólicos de bajo peso molecular investigados. Por lo tanto, el rango de masas seleccionado fue analíticamente apropiado y optimizado para los analitos de interés incluidos en este estudio.

La fase móvil consistió en acetonitrilo (Solvente A) y agua acidificada al 0.1% con ácido fórmico (Solvente B). La presencia de ácido fórmico en la fase acuosa contribuyó a lograr condiciones de ionización estables y reproducibles en la interfaz de electrospray, mientras que el acetonitrilo mejoró la resolución cromatográfica y minimizó el ensanchamiento de picos. Se logró una separación adecuada de todos los analitos, con valores de resolución ($R_s > 1.5$) que confirmaron la separación completa. Estas condiciones son consistentes con informes previos que demuestran la eficacia de este sistema de disolventes para el análisis de compuestos fenólicos mediante UHPLC-DAD-ESI-MS/MS [106,107].

6.3.2. Condiciones SRM (*Selected Reaction Monitoring*)

Una vez optimizadas las condiciones de separación cromatográfica, cada compuesto fenólico fue identificado con base en sus espectros UV/Vis, ion precursor $[M-H]^-$, transición MS/MS, tiempo de retención (t_r) y con datos reportados en la literatura científica. La cuantificación de los trece compuestos fenólicos se realizó en modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*, monitoreo de reacciones seleccionadas). La **Tabla 6.4** resume las condiciones de análisis de los compuestos fenólicos en modo SRM.

El compuesto **1** fue identificado como ácido gálico con longitudes de onda de máxima absorción a 217.97 y 272.62 nm, transición $[169.06/125.04, m/z]$ y tiempo de retención de 1.11 min. Longitudes de onda y transiciones MS/MS similares han sido reportadas en otros estudios [108,109]. El compuesto **2** fue identificado como ácido 4-hidroxibenzoico con longitudes de onda máxima absorción a 197.96 y 256.69 nm, la transición $[137.09/92.81, m/z]$ y un tiempo de retención de 3.50 min.

El compuesto **3** fue identificado como ácido clorogénico con longitudes de onda de máxima absorción a 228.13 y 326.67 nm, la transición $[353.15/190.71, m/z]$ y un tiempo de retención de 4.45 min. Las transiciones $[353.5/191.3]$ también fueron reportadas para el ácido clorogénico por Truong et al. [109]. Seguidamente, el compuesto **4** fue identificado como ácido cafeico con longitudes de onda de máxima absorción de 228.08, 238.28 y 324.06 nm, la transición $[179.08/134.79, m/z]$ y un tiempo de retención de 4.82 min. El compuesto **5** fue identificado como (-)-epicatequina con longitudes de onda de máxima absorción a 206.08, 230.75 y 281.65 nm, transición $[289.13/244.86, m/z]$, y un tiempo de retención de 5.84 min. Las transiciones MS/MS de los compuestos fenólicos **1**, **2**, **4** y **5** son consistentes con el ion precursor y el ion producto reportados en una investigación previa [110].

El compuesto **6** fue identificado como ácido p-cumárico con longitudes de onda de máxima absorción a 311.46, 229.83 y 193.64 nm, transición $[163.10/119.10, m/z]$ y un tiempo de retención de 6.81 min. El compuesto **7** fue identificado como ácido ferúlico con longitudes de máxima absorción a 324.05 y 240.36 nm, transición $[193.36/133.86, m/z]$, y tiempo de retención de 8.03 min.

Tabla 6.4 Condiciones de análisis para la determinación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM.

Analito	F.M.	P.M.	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	Ion Molecular [M-H] ⁻	E. C. (V)	Iones producto (m/z)
1	C ₇ H ₆ O ₅	170.12	1.11	217.97, 272.62	169.06	15	[125.04], 168.8
2	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	3.50	197.96, 256.69	137.09	15	[92.81], 93.54, 136.99
3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.3	4.45	228.13, 326.67	353.15	15	[190.71], 191.46
4	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	4.82	228.08, 238.28, 324.06	179.08	15	[134.79], 135.41
5	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	5.84	206.08, 230.75, 281.65	289.13	15	[244.86], 288.85, 203.72, 289.57
6	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	6.81	311.46, 229.83, 193.64	163.10	15	[119.10], 163.39
7	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.186	8.03	324.05, 240.36	193.36	15	[133.86], 177.63, 134.63
8	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.52	10.99	258.30, 353.08	609.21	35	[300.37], 299.56, 301.39
9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.38	11.47	353.08, 258.55	463.16	25	[300.46], 299.59, 301.31
10	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.52	15.59	267.77, 346.33	593.21	30	[284.55], 285.36, 592.58, 283.57, 593.49
11	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.55	17.01	256.82, 353.38	623.26	30	[314.67], 315.42
12	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.338	22.17	246.07, 376.26	301.09	25	[272.63], 300.76, 273.46, 150.71, 255.46, 179.18
13	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.23	22.95	249.80, 264.34, 375.31	285.08	40	[255.19], 181.94, 182.62, 227.51, 142.96, 93.35

Compuestos fenólicos: **1.** Ácido gálico, **2.** Ácido 4-Hidroxibenzoico, **3.** Ácido clorogénico, **4.** Ácido cafeico, **5.** (-)-Epicatequina, **6.** Ácido p-cumárico, **7.** Ácido ferúlico, **8.** Rutina, **9.** Quercetina-3-glucósido, **10.** Kaempferol-3-rutinósido, **11.** Isorhamnetina-3-rutinósido, **12.** Quercetina, **13.** Kaempferol, F. M.: Fórmula Molecular; P. M.: Peso Molecular; t_R: Tiempo de retención; V: Voltaje. E. C.: Energía de colisión.

El compuesto **8** fue identificado como rutina con longitudes de onda de máxima absorción a 258.30 y 353.08 nm, transición [609.21/300.37, m/z] y un tiempo de retención de 10.99 min. Estas transiciones también fueron reportadas en la literatura para la cuantificación de rutina mediante UHPLC-MS/MS [111]. El compuesto **9** fue identificado como quercetina-3-glucósido, con longitudes de onda de máxima absorción a 353.08 y 258.55 nm, transición [463.16/300.46 m/z] y tiempo de retención de 11.47 min.

El compuesto **10** fue identificado como kaempferol-3-rutinosido con longitudes de onda de máxima absorción a 267.77 y 346.33, transición [593.21/284.55, m/z] y un tiempo de retención de 15.59 min. Transiciones similares para los compuestos **9** [463.088878/301, m/z] y **10** [593.15199/285, m/z] fueron descritas en otra investigación sobre compuestos fenólicos [112]. El compuesto **11** fue identificado como isorhamnetina-3-rutinósido con longitudes de onda de máxima absorción a 256.82 y 353.38 nm, transición [623.26/314.67, m/z] y un tiempo de retención de 17.01 min.

El compuesto **12** fue identificado como quercetina con longitudes de onda de máxima absorción a 246.07 y 376.26 nm, transición [301.09/272.03, m/z] y tiempo de retención de 22.17 min. El compuesto **13** fue identificado como kaempferol con longitudes de onda de máxima absorción a 249.80, 264.34 y 375.31 nm, transición [285.08/255.19, m/z] y un tiempo de retención de 22.95 min. Las transiciones MS/MS de los compuestos fenólicos **1**, **3**, **4**, **5**, **7**, **8**, **12**, y **13** son consistentes con los resultados reportados por Wang et al. [111].

Los resultados obtenidos demuestran que la identificación de los trece compuestos fenólicos mediante UHPLC-ESI-MS/MS está en concordancia con los hallazgos reportados en la literatura científica.

6.3.3. Parámetros analíticos del método cromatográfico UHPLC-ESI-MS/MS

Los resultados de linealidad, coeficientes de determinación, LODs y LOQs se resumen en la **Tabla 6.5**.

Las curvas de calibración mostraron una buena linealidad, con coeficientes de determinación entre 0.9974 y 0.9995. Estos se determinaron mediante regresión lineal graficando el área de la señal analítica en modo SRM frente a siete niveles de concentración de cada solución estándar mixta.

Los LODs y LOQs instrumentales de los analitos oscilaron entre 1 y 65 µg/L y entre 5 y 198 µg/L, respectivamente. Algunos valores de LODs y LOQs fueron comparables a los reportados por Nzekoue et al. [113] y Cortese et al. [114] utilizando HPLC-MS/MS.

En general, los valores de LODs y LOQs obtenidos en este trabajo fueron menores a los reportados previamente por Irakli et al. [115] y Wang et al. [111] lo que evidencia que el método propuesto presenta sensibilidad adecuada para la determinación de los compuestos fenólicos evaluados en extractos de ulluco

Tabla 6.5 Parámetros analíticos del método cromatográfico UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM.

Nº	Compuestos fenólicos	Rango lineal, µg/L	Ecuaciones de regresión	R ²	LOD, µg/L	LOQ, µg/L
1	Ácido gálico	50 – 3000	$y = 0.3909x - 23.439$	0.9974	17	50
2	Ácido 4-hidroxibenzoico	43 – 3000	$y = 0.3217x - 0.3426$	0.9982	14	43
3	Ácido clorogénico	7 – 3000	$y = 4.6266x - 308.97$	0.9983	2	7
4	Ácido cafeico	26 – 3000	$y = 2.9119x - 99.085$	0.9978	9	26
5	(-)-Epicatequina	6 – 3000	$y = 2.0048x + 9.236$	0.9993	2	6
6	Ácido p-coumárico	15 – 1000	$y = 1.2108x + 1.4161$	0.9987	5	15
7	Ácido ferúlico	8 – 1000	$y = 0.1266x - 2.7177$	0.9979	3	8
8	Rutina	9 – 3000	$y = 10.384x - 199.12$	0.9994	3	9
9	Quercetina-3-glucósido	11 – 3000	$y = 21.791x - 383.01$	0.9980	4	11
10	Kaempferol-3-rutinósido	17 – 3000	$y = 11.479x - 46.996$	0.9991	6	17
11	Isorhamnetina-3-rutinósido	25 – 3000	$y = 11.838x + 230.19$	0.9995	8	25
12	Quercetina	198 – 3000	$y = 0.1931x - 22.305$	0.9978	65	198
13	Kaempferol	82 – 3000	$y = 0.1332x - 2.8757$	0.9981	27	82

R²: Coeficiente de determinación; LOD: Límite de detección instrumental; LOQ: Límite de cuantificación instrumental

6.3.4. Extracción en fase sólida SPE-C8

Diversos estudios han reportado el uso de cartuchos SPE-C18 como paso previo para determinar compuestos fenólicos en matrices alimentarias. Sin embargo, en el presente estudio se seleccionó un cartucho C8 por dos razones principales. En primer lugar, el cartucho SPE-C8 permitió reducir interferencias de matriz presentes en los extractos de ulluco y proteger el sistema cromatográfico, el cual no incluía columna de guarda. Para evaluar este efecto, se inyectó al sistema cromatográfico una alícuota del extracto U-1 sin pasar por SPE-C8 y otra alícuota pasando por SPE-C8. Como se muestra en los anexos (**Figura 9.1 a y b**), tanto el cromatograma de iones totales (TIC) como el de UV/Vis a 280 nm obtenidos después del tratamiento con SPE-C8 revelaron una reducción sustancial de compuestos interferentes, lo que resultó en una mejora de la selectividad y sensibilidad para determinar los compuestos fenólicos. En segundo lugar, Pacheco et al. [14] reportaron que los flavonoles son el grupo fenólico predominante en el ulluco amarillo-rosado. En concordancia con esta observación, los cromatogramas del extracto morado (U-1) (**Figura 9.1**) mostraron señales analíticas en tiempos de retención correspondientes a los flavonoides investigados. Esto sugiere que el tratamiento con SPE-C8 es adecuado para el análisis cromatográfico. Posteriormente, se evaluaron la precisión y la recuperación del método analítico.

La **Tabla 6.6** resume los resultados de precisión y recuperación obtenidos para los cuatro flavonoides que presentaron recuperaciones aceptables en la muestra de ulluco morado (U-1).

Los valores de las RSDs para repetibilidad y la precisión intermedia fueron inferiores al 10%, lo que indica una precisión adecuada del procedimiento analítico, considerando la extracción asistida por ultrasonido, la limpieza mediante SPE-C8 y el análisis por UHPLC-ESI-MS/MS.

Tabla 6.6 Precisión y recuperación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM en ulluco morado (U-1).

Compuesto fenólico	Repetibilidad (n = 9)		Precisión intermedia (n = 9)		Recuperación (n = 3)		
					40	100	200
	$\bar{x}$	RSD	$\bar{x}$	RSD	$\mu\text{g/g}$ %	$\mu\text{g/g}$ %	$\mu\text{g/g}$ %
Rutina (8)	162	6%	153	7%	98	94	86
Quercetina-3-glucósido (9)	7.1	5%	7.6	7%	89	91	91
Kaempferol-3-rutinósido (10)	28	5%	27	8%	91	94	92
Isorhamnetina-3-rutinósido (11)	83	7%	85	10%	86	90	87

La precisión del método fue evaluada utilizando extractos independientes de ulluco morado (U-1), preparados mediante EAU y limpieza por SPE-C8. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}$ DW. La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación para los cuatro flavonoides que presentaron recuperaciones aceptables. RSD: desviación estándar relativa.

En general, la purificación de la muestra mediante cartuchos SPE-C8 resultó eficaz para reducir las interferencias de la matriz y mejorar la selectividad y la sensibilidad. Si bien los cartuchos SPE-C18 se utilizan habitualmente para el análisis de compuestos fenólicos, el uso de SPE-C8 resultó adecuado para el análisis cromatográfico de extractos de ulluco, en particular de cuatro flavonoides.

En cuanto a la cuantificación, se obtuvieron una precisión y una recuperación satisfactorias para los flavonoides. Los valores de recuperación oscilaron entre 86 y 98% para los compuestos 8, 9, 10 y 11, los cuales fueron considerablemente más altos que los obtenidos para los demás compuestos fenólicos, cuyos porcentajes de recuperación fueron notablemente bajos (por debajo del 36%). Este comportamiento puede atribuirse a la mayor polaridad de los ácidos fenólicos e hidroxicinámicos, los cuales pudieron haber sido parcialmente eluidos durante la etapa de lavado con agua, empleada para eliminar interferencias de matriz altamente polares.

Según Pereira, O. R. et al. [82], valores de recuperación entre 50 % y 120 % son considerados aceptables cuando están acompañados de RSDs inferiores al 15%. Por consiguiente, la cuantificación para los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 13 debe interpretarse como tentativa en las muestras de ulluco, mientras que los resultados obtenidos para las flavonoides 8, 9, 10 y 11 pueden considerarse confiables.

6.3.5. Determinación de compuestos fenólicos en cinco variedades de ulluco

Para determinar la composición fenólica del ulluco, los extractos obtenidos mediante el método propuesto se analizaron mediante el sistema UHPLC-ESI-MS/MS para generar los perfiles cromatográficos de las cinco variedades. Se examinaron los cromatogramas de iones totales (TIC) para confirmar la presencia de los compuestos. En la **Figura 6.4**, se muestran los cromatogramas de iones totales de cada variedad de ulluco analizada.

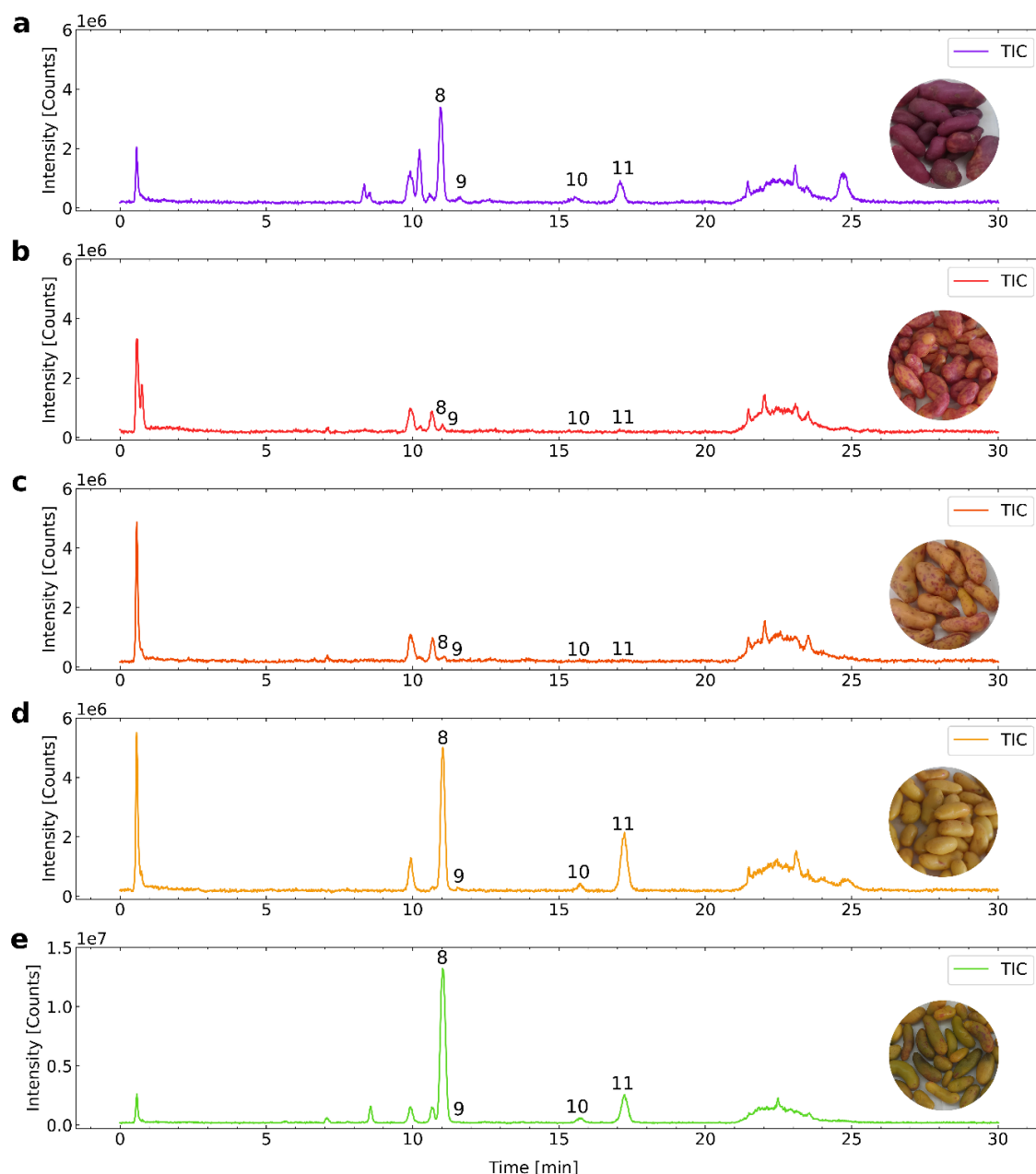


Figura 6.4 Cromatograma de iones totales (Total ion chromatograms, TICs) obtenido mediante el sistema UHPLC-ESI-MS/MS para cinco variedades de *Ullucus tuberosus*: (a) morado (U-1), (b) morado-naranja (U-2), (c) naranja-amarillo (U-3), (d) amarillo (U-4), y (e) amarillo-verde (U-5); Señales: 8. Rutina, 9. Quercetina-3-glucósido, 10. Kaempferol-3-rutinósido, 11. Isorhamnetina-3-rutinósido.

Los flavonoides fueron el grupo más abundante de compuestos fenólicos en todas las variedades de ulluco analizadas en este estudio. Los TICs claramente revelaron la presencia de los analitos 8, 9, 10 y 11 en las cinco muestras. Entre ellas, las variedades morada, amarilla y amarillo-verde mostraron señales más intensas de rutina que las variedades morada-anaranjada y naranja-amarilla. Los compuestos 1 a 7 no se detectaron en ninguna variedad dentro del intervalo de retención de 0 a 10 minutos.

A partir de los TICs y los cromatogramas registrados a 210, 280, 320 y 370 nm de cada variedad de ulluco (Anexos, **Figuras 9.2 a 9.7**), se identificaron cuatro flavonoides —rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido— mediante la comparación de sus espectros UV/Vis, iones moleculares desprotonados ($[M-H]^-$) y tiempos de retención con los de estándares analíticos comerciales. Si bien aparecieron señales adicionales en los tiempos de retención del ácido gálico, el ácido clorogénico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico, sus espectros de masas mostraron múltiples iones moleculares, lo que indica coelución y baja abundancia del analito.

Posteriormente, los extractos de ulluco fueron analizados en el sistema cromatográfico UHPLC-ESI-MS/MS en modo SRM, un método altamente sensible y selectivo para la identificación y cuantificación de analitos en concentraciones bajas y que no se detectaron en el cromatograma de iones totales. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 6.7**.

Tabla 6.7 El contenido ($\mu\text{g/g}$) de trece compuestos fenólicos investigados en cinco variedades de *Ullucus tuberosus* mediante UHPLC-ESI-MS/MS

Nº	Compuestos fenólicos	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
1	*Ácido gálico	3.20 ± 0.02	4.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1	ND	ND
2	*Ácido 4-hidroxi-benzoico	ND	ND	ND	ND	ND
3	*Ácido clorogénico	3.123 ± 0.002	3.07 ± 0.01	ND	ND	ND
4	*Ácido cafeico	< LOQ	< LOQ	< LOQ	ND	ND
5	*(-)-Epicatequina	ND	ND	ND	ND	ND
6	*Ácido p-cumárico	ND	ND	ND	ND	ND
7	*Ácido ferúlico	ND	< LOQ	ND	ND	ND
8	Rutina	143 ± 3^b	14.1 ± 0.6^a	10.0 ± 0.2^a	201 ± 7^c	499 ± 17^d
9	Quercetina-3-glucósido	7.3 ± 0.5^d	0.92 ± 0.01^a	0.882 ± 0.003^a	4.1 ± 0.2^c	1.41 ± 0.03^b
10	Kaempferol-3-rutinósido	29 ± 1^b	6.1 ± 0.3^a	8.0 ± 0.2^a	27 ± 1^b	45 ± 2^c
11	Isorhamnetina-3-rutinósido	81 ± 6^b	9.3 ± 0.2^a	3.6 ± 0.1^a	129 ± 4^b	142 ± 5^c
12	*Quercetina	< LOQ	ND	ND	ND	ND
13	*Kaempferol	ND	ND	< LOQ	ND	ND

Los resultados están expresados en $\mu\text{g/g}$ DW (Dry Weight); (*): Cuantificación tentativa; U-1: Ulluco morado; U-2: Ulluco morado-naranja; U-3: Ulluco naranja-amarillo; U-4: Ulluco amarillo; U-5: Ulluco amarillo-verde; LOQ: Límite de cuantificación; s: Desviación estándar; ND: No detectado. Diferentes letras (a-d) dentro de una fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las distintas variedades de ulluco.

El ácido gálico fue tentativamente cuantificado en las variedades morada, morada-naranja y naranja-amarillo. En contraste, el ácido 4-hidroxibenzoico, la (-)-epicatequina y el ácido p-cumárico no fueron detectados en todos los extractos de ulluco. El ácido ferúlico fue detectado

por debajo del LOQ en la variedad morado-naranja. La quercetina fue identificada únicamente en el extracto de la variedad morada, y el kaempferol en la variedad naranja-amarilla.

Las concentraciones de los cuatro flavonoides cuantificados variaron entre las variedades analizadas. La rutina fue el compuesto mayoritario, especialmente en la variedad amarillo-verde (U-5), seguida por la variedad amarilla (U-4) y la morada (U-1). La quercetina-3-glucósido se cuantificó en todas las variedades, con mayor concentración en U-1. De acuerdo con los antecedentes revisados, la presencia de quercetina-3-glucósido no ha sido reportada previamente de manera específica en variedades de ulluco. Por su parte, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido también se detectaron en las cinco variedades, observándose mayores niveles en ulluco amarillo-verde (U-5) y ulluco amarillo (U-4), respectivamente.

De acuerdo con el ANOVA y la prueba de Duncan, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los contenidos de rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido entre las variedades analizadas. El análisis estadístico no se aplicó a los compuestos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 13** debido a su baja recuperación, ausencia de detección o presencia bajo el LOQ, por lo que sus resultados fueron considerados tentativos.

Estudios previos han reportado el contenido fenólico de otras variedades de ulluco usando técnicas cromatográficas. Pacheco et al. [14], determinaron de manera tentativa compuestos no antocianicos en tubérculos andinos, y encontraron que el ulluco amarillo rosa también contiene flavonoides. En otro estudio, Sánchez-Portillo et al. [15] identificaron ácidos hidroxicinámicos, flavonoides tanto en la harina como en la cáscara del ulluco rojo-morado. De manera similar, Zabaleta et al. [70] reportaron el contenido de ácido clorogénico, ácido ferúlico y rutina. Los valores del contenido de rutina en su estudio son similares a los resultados obtenidos para las variedades morada y amarilla en este trabajo.

Los resultados obtenidos amplían el conocimiento actual sobre la composición fenólica del ulluco y evidencian diferencias entre variedades en el contenido de flavonoides glicosilados. En particular, la combinación de métodos espectrofotométricos y UHPLC-ESI-MS/MS permitió relacionar la respuesta global de CFT y AA con la presencia de compuestos fenólicos individuales, aportando una caracterización analítica más completa de las variedades estudiadas.

6.3.6. Correlación estadística y análisis de componentes principales (PCA)

La correlación estadística entre el CFT, FRAP, rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido de las variedades de ulluco se muestra en la **Figura 6.5**. Los p -valores de la correlación estadística de Pearson se muestran en los anexos (**Tabla 9.2**).

Los resultados obtenidos muestran una correlación fuerte y estadísticamente significativa ($r = 0.97$, $p < 0.05$) entre el CFT y el FRAP (**Figura 6.5 b**), lo que sugiere una asociación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante determinada mediante FRAP. Se han reportado relaciones similares entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante FRAP en otros tubérculos andinos [116]. Asimismo, la coloración de los tubérculos puede estar asociada con su actividad antioxidante [117]; la variedad amarilla de ulluco presentó valores de CFT y FRAP más bajos que las demás variedades analizadas. Sin embargo, dentro del alcance de este estudio, no se puede establecer de manera concluyente una relación directa entre el color del tubérculo y el CFT/AA, puesto que las muestras de ulluco también pueden contener otros

compuestos que contribuyen a la pigmentación del tubérculo como las betalainas, las cuales han sido reportadas en estudios previos [17].

Como señalan Muñoz et al. [105], la actividad antioxidante no puede explicarse únicamente por el contenido fenólico total; la caracterización de los compuestos fenólicos individuales es necesaria para establecer las relaciones estructura-actividad. Además, las condiciones de procesamiento y almacenamiento de las muestras pueden influir tanto en la pigmentación como en las mediciones de la actividad antioxidante.

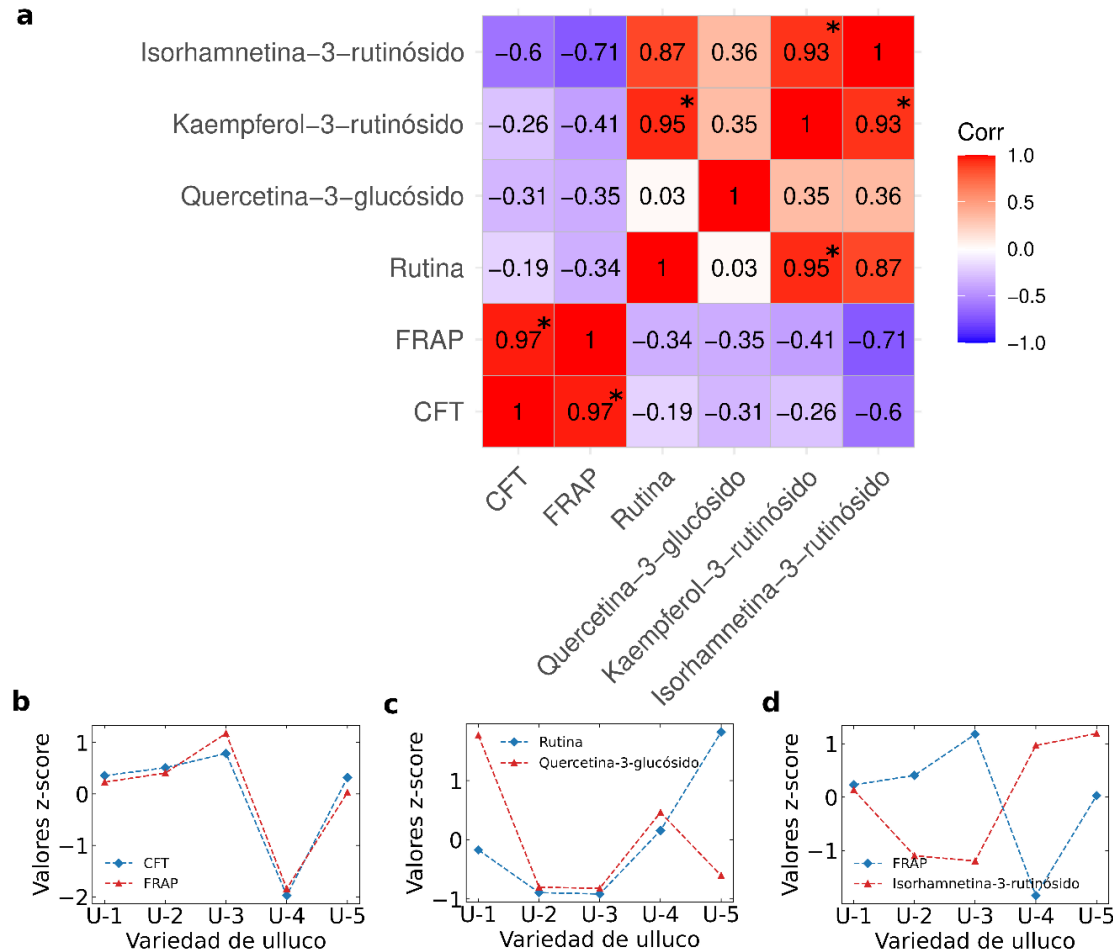


Figura 6.5 (a) Correlación estadística de Pearson ($p < 0.05$) entre CFT, FRAP, rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido, e isorhamnetina-3-rutinósido de las variedades de *Ullucus tuberosus*; (*): Estadísticamente significativo; **(b)** muestra una correlación positiva entre CFT y FRAP; **(c)** muestra una correlación cercana a cero entre la rutina y la quercetina-3-glucósido, y **(d)** muestra una anticorrelación entre FRAP e isorhamnetina-3-rutinósido.

Una correlación fuerte y significativa también fue observada entre los flavonoides, como la rutina y el kaempferol-3-rutinósido ($r = 0.95$, $p < 0.05$), y entre el kaempferol-3-rutinósido y la isorhamnetina-3-rutinósido ($r = 0.93$, $p < 0.05$), lo que sugiere que estos compuestos comparten características estructurales y funcionales similares, particularmente con derivados del kaempferol, en los extractos de ulluco. Al ser flavonoides glicosilados, es probable que presenten propiedades antioxidantes comparables, lo que sugiere una variación conjunta de estos flavonoides entre las variedades analizadas. En contraste, tanto el CFT como el FRAP mostraron

correlaciones negativas con la rutina, la quercetina-3-glucósido, el kaempferol-3-rutinósido y la isorhamnetina-3-rutinósido, observándose la correlación negativa más fuerte entre el FRAP y la isorhamnetina-3-rutinósido ($r = -0.71$, $p \geq 0.05$) (**Figura 6.5 d**). Por otro lado, no se observó una correlación significativa entre la quercetina-3-glucósido y la rutina (**Figura 6.5 c**), lo que sugiere que estos compuestos presentan propiedades distintas y contribuyen de forma independiente a la actividad antioxidante.

Este comportamiento sugiere que la respuesta global de CFT y FRAP no se explica únicamente por los cuatro flavonoides cuantificados, sino también por otros componentes de la matriz que no fueron determinados individualmente en esta etapa.

Posteriormente, se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) con el CFT, la actividad antioxidante FRAP, la rutina, la quercetina-3-glucósido, el kaempferol-3-rutinósido y la isorhamnetina-3-rutinósido para explorar la variabilidad entre los tubérculos de ulluco. La **Figura 6.6** ilustra el biplot del PCA para las cinco variedades de ulluco.

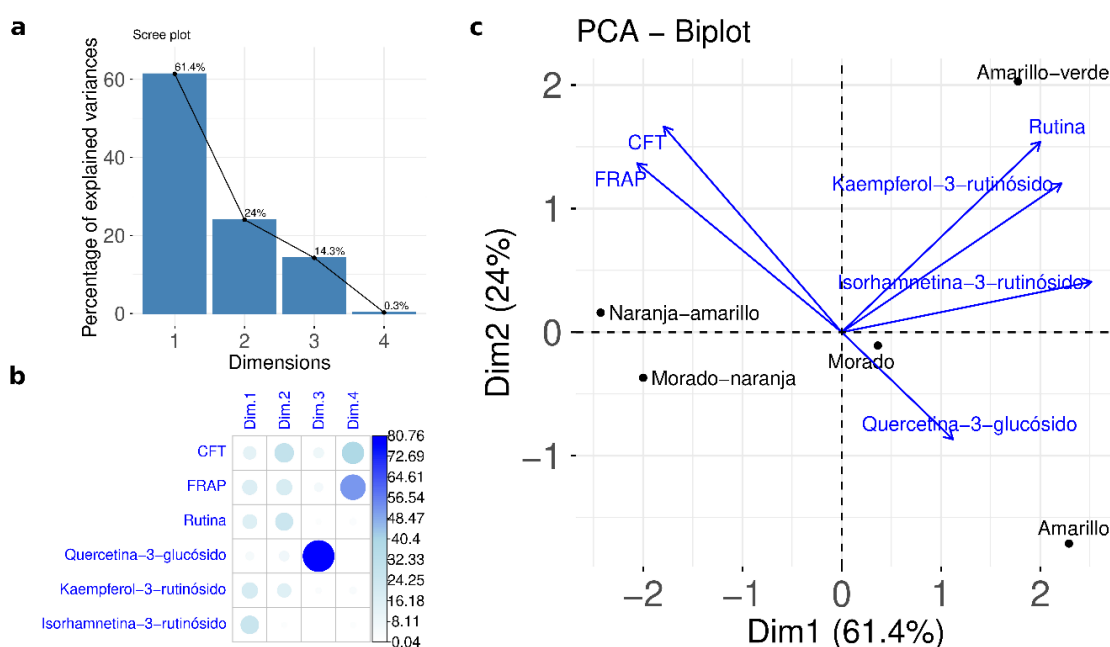


Figura 6.6 Análisis de componentes principales (PCA, Principal Component Analysis) de las variedades de ulluco: (a) Gráfico de sedimentación que muestra el porcentaje de varianza explicado para cada componente principal, (b) Gráfico de contribución de las variable para cada componente, (c) Biplot del PCA que muestra la distribución de las variedades de ulluco y la contribución de las variables analizadas.

El primer y segundo componente del PCA explicaron el 61.4% y el 24% de la varianza, respectivamente (**Figura 6.6 a**). Esto significa que el 85.4% de la variabilidad de los datos experimentales de CFT, actividad antioxidante FRAP, rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido se explica por el biplot del PCA. La isorhamnetina-3-rutinósido fue el principal contribuyente (26.43%) del PC1 seguido por el kaempferol-3-rutinósido (20.46%).

Por otro lado, el principal contribuyente del PC2 fue el CFT (29.54%), seguido de la rutina (25.30%) y de la actividad antioxidante FRAP (19.93%) (**Figura 6.6 b**). Todos los flavonoides se

ubicaron en el lado derecho del eje F1 en el biplot del PCA, lo que sugiere una asociación entre estas variedades y el contenido de flavonoides glicosilados cuantificados (**Figura 6.6 c**).

El análisis de componentes principales diferenció eficazmente las variedades de ulluco en función de su composición fenólica, actividad antioxidante y contenido fenólico total. La distribución de las muestras en el biplot refleja diferencias en la contribución relativa de CFT, FRAP y los flavonoides cuantificados. En particular, las variedades naranja-amarillo y morado-naranja se ubicaron hacia el lado negativo del PC1, mientras que las variedades con mayores contenidos de flavonoides glicosilados se asociaron principalmente con el lado positivo de este componente. En general, el PCA reveló patrones de agrupamiento distintos que reflejan variaciones en la composición fenólica y la actividad antioxidante entre las variedades de ulluco analizadas.

Implicancias composicionales de los compuestos fenólicos identificados

Numerosos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos contribuyen a la salud humana mediante mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios [26,118,119]. En la **Figura 6.7** se ilustran algunas propiedades farmacológicas reportadas en la literatura científica para los cuatro flavonoides identificados y cuantificados en las muestras de ulluco.

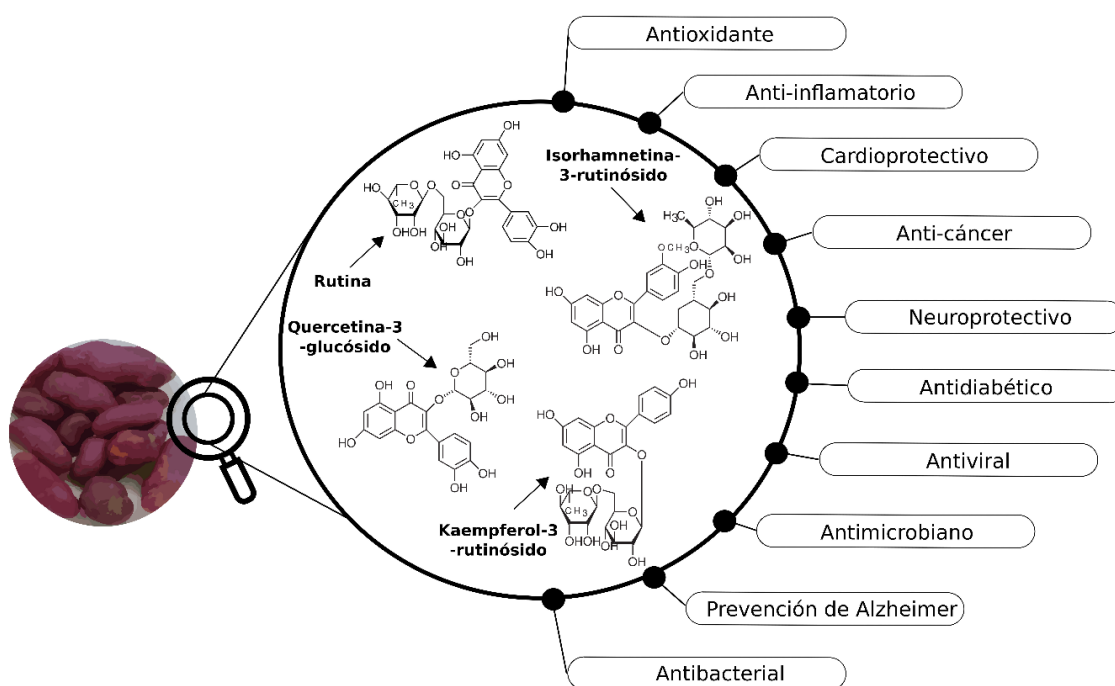


Figura 6.7 Representación esquemática de las propiedades farmacológicas reportadas en la literatura científica para la rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido.

Los flavonoides identificados en las cinco variedades de ulluco principalmente rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido, han sido descritos en la literatura como compuestos de interés fitoquímico en matrices vegetales [120,121].

Sin embargo, los resultados de esta tesis deben interpretarse desde una perspectiva analítica y composicional, debido a que no se realizaron ensayos biológicos, estudios de biodisponibilidad ni evaluaciones farmacológicas. En este sentido, la identificación y cuantificación de estos compuestos contribuyen a ampliar el conocimiento sobre el perfil fenólico del ulluco y entregan antecedentes para futuros estudios orientados a evaluar su potencial funcional.

6.4. Objetivo específico 4: Determinación espectrofotométrica de carbohidratos totales y azúcares reductores.

6.4.1. Parámetros analíticos del método fenol-sulfúrico y DNSA

Los métodos de fenol-sulfúrico y DNSA han sido ampliamente aplicados para la determinación de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores, respectivamente, utilizando glucosa como estándar de calibración [122–124]. La **Figura 6.8** muestra el espectro de absorción UV/Vis y las curvas de calibración para la determinación de carbohidratos solubles totales (**Figuras 6.8 a y b**) y de azúcares reductores (**Figuras 6.8 c y d**).

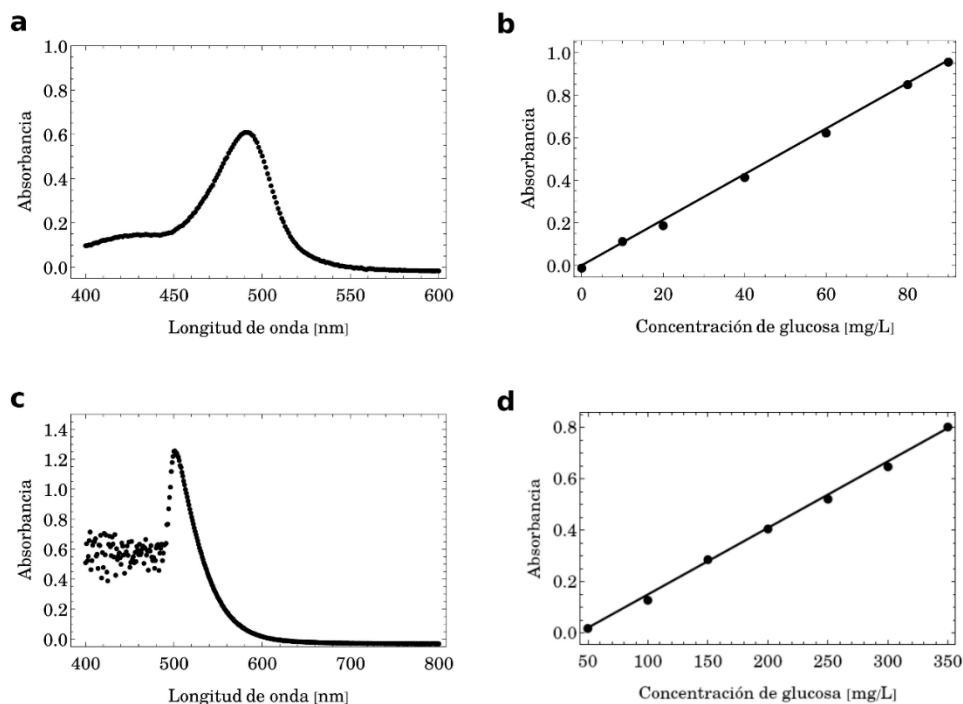


Figura 6.8 Espectro de absorción UV/Vis medido entre 400 y 800 nm y rangos lineales de los métodos espectrofotométricos: **a y b**, espectro UV/VIS y rango lineal para el método fenol-sulfúrico; **c y d**, espectro UV/Vis y rango lineal para azúcares reductores.

De acuerdo con los análisis realizados, la longitud de onda de máxima absorción del complejo coloreado con el método fenol-sulfúrico fue de 490 nm, lo cual está en concordancia con estudios previos [54,125]. Por otro lado, la longitud de onda de absorción máxima del complejo coloreado para el método DNSA se observó entre 450 y 550 nm, aunque el método original indica la lectura de absorbancia a 540 nm [55]. Recientemente, se estudió el efecto de la longitud de onda en la cuantificación de azúcares reductores entre 500 y 700 nm, indicando una linealidad óptima

($R^2 > 0.999927$) a 540 nm cuando la concentración de la muestra es < 25 g/L [122]. Por lo tanto, se seleccionó una longitud de onda de 540 nm como la adecuada para este análisis.

Los parámetros analíticos para ambos métodos espectrofotométricos fenol-sulfúrico y DNSA se resumen en las **Tablas 6.8 y 6.9**, respectivamente.

Tabla 6.8 Parámetros analíticos del método espectrofotométrico fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos solubles totales.

Parámetros analíticos	Método fenol-sulfúrico
Pendiente (L/mg)	0.0107 ± 0.0001
Intercepto	0.0003 ± 0.0101
Rango lineal, mg/L	0 - 90
Rango de trabajo, mg/L	12-90
Coefficiente de determinación, R^2	0.9989
Error típico	0.01
Límite de detección, mg/L	4.0
Límite de cuantificación, mg/L	12.0
Repetibilidad instrumental	2.3 % 15 mg/L
(RSD, n = 6)	1.7 %, 35 mg/L
	1.3 %, 75 mg/L
Precisión intermedia instrumental	2.6 % 15 mg/L
(RSD, n = 6)	1.9 %, 35 mg/L
	1.6 % 75 mg/L
Repetibilidad del método	8 %
(RSD, n=9)	
Precisión intermedia del método	9 %
(RSD, n=9)	
% Recuperación (n=3)	
15	80 ± 4
45	97 ± 7

Se evaluó la precisión instrumental con soluciones estándar de glucosa a 15, 35 y 75 mg/L. La precisión del método se evaluó con el extracto de ulluco amarillo (U-4) y se expresó en términos de repetibilidad (un analista, en el mismo día y en el mismo laboratorio) y precisión intermedia (un analista, en diferentes días y en el mismo laboratorio). La exactitud se expresó como porcentaje de recuperación, enriqueciendo la muestra de ulluco amarillo con cantidades conocidas de glucosa a dos niveles de concentración; RSD: Relative Standard Deviation.

Tabla 6.9 Parámetros analíticos del método espectrofotométrico DNSA para la determinación de azúcares reductores.

Parámetros analíticos	Método DNSA
Pendiente (L/mg)	0.00258 ± 0.00004
Intercepto	-0.107 ± 0.008
Rango lineal, mg/L	50 – 350
Rango de trabajo, mg/L	48-350
Coefficiente de determinación, R ²	0.9979
Error típico	0.02
Límite de detección, mg/L	14
Límite de cuantificación, mg/L	48
Repetibilidad instrumental	2.3 %, 80 mg/L
(RSD, n = 6)	1.3 %, 160 mg/L
	0.9 %, 260 mg/L
Precisión intermedia instrumental	1.9 %, 80 mg/L
(RSD, n = 6)	1.3 %, 160 mg/L
	1.9 %, 260 mg/L
Repetibilidad del método	2 %
(RSD, n = 9)	
Precisión intermedia del método	5 %
(RSD, n = 9)	
% Recuperación (n=3)	
15 mg	104 ± 7
45 mg	90 ± 5

Se evaluó la precisión instrumental con soluciones estándar de glucosa a 15, 35 y 75 mg/L. La precisión del método se evaluó con el extracto de ulluco amarillo (U-4). La precisión se expresó en términos de repetibilidad (un analista, en el mismo día y en el mismo laboratorio) y la precisión intermedia (un analista, en diferentes días y en el mismo laboratorio). La exactitud fue reportada como porcentaje de recuperación, enriqueciendo la muestra de ulluco amarillo con cantidades conocidas de glucosa a dos niveles de concentración RSD: Relative Standard Deviation

Las curvas de calibración para el método de fenol-ácido sulfúrico y DNSA se obtuvieron graficando las absorbancias frente a los niveles de concentración de soluciones estándar de glucosa. Se consideraron la ecuación lineal, el coeficiente de regresión (R²) y el coeficiente estadístico F para determinar si las variables de concentración y absorbancia están correlacionadas linealmente.

El ANOVA mostró que los modelos de calibración fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en los rangos evaluados de 0 a 90 mg/L de D-glucosa para el método de fenol-ácido sulfúrico y de 50 a 350 mg/L de D-glucosa para el método DNSA. Los coeficientes de determinación para ambos métodos ($R^2 > 0.9979$) revelaron una buena linealidad, con razonables y bajos LODs y LOQs en el amplio rango de concentraciones evaluadas. Estas observaciones son consistentes con investigaciones previas que utilizaron los ensayos de fenol-ácido sulfúrico y DNSA para determinar carbohidratos solubles totales y azúcares reductores, respectivamente [123].

Se evaluó la precisión del instrumental en términos de repetibilidad y precisión intermedia. El método de fenol-ácido sulfúrico demostró ser preciso (RSD < 2.3 para la repetibilidad y RSD < 2.6 para la precisión intermedia). La presión instrumental del método DNSA osciló entre 0.9 y 2.3 % y entre 1.3 y 1.9 % para la repetibilidad y la precisión intermedia, respectivamente. Por otro lado, la precisión de los métodos espectrofotométricos que incluye la EAU fue menor al 10%, lo cual indica que el método es aceptable y confiable [100]. El porcentaje de recuperación osciló entre 80 y 97 % para el CFT y entre 90 y 104 % de AR, lo que sugiere que el método es aceptable para las determinaciones espectrofotométricas [74]. Wood et al. [122] y Negrulescu, et al. [126] describieron que el método DNSA es significativamente más rápido y preciso que otros métodos colorimétricos.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de las curvas de calibración durante 72 horas para los métodos espectrofotométricos fenol-sulfúrico y DNSA, se compararon las pendientes de las curvas de regresión mediante la prueba de Duncan. Los resultados no mostraron diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%, entre las pendientes de las tres curvas a las 1, 24 y 72 horas, respectivamente. Por lo tanto, las curvas de calibración pueden almacenarse durante 72 horas sin cambios significativos en la absorbancia, como se muestra en la **Figura 6.9**. En otras palabras, las curvas de calibración fueron estables durante el tiempo experimental evaluado.

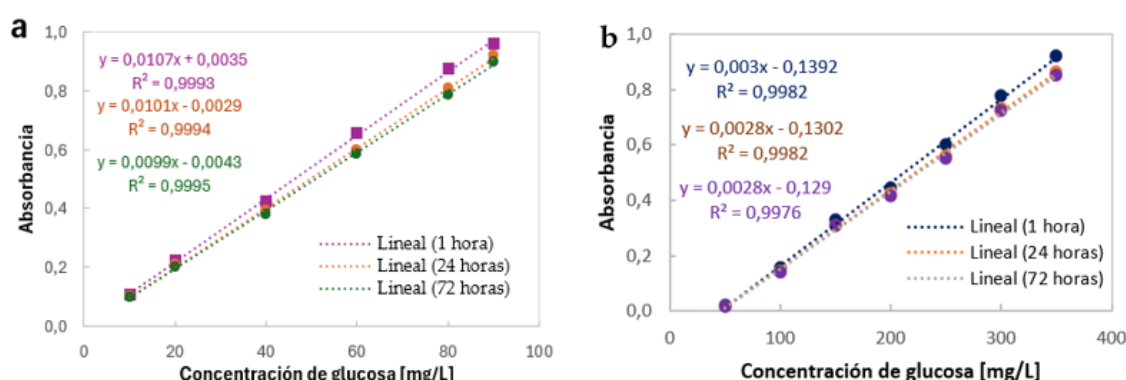


Figura 6.9 Estabilidad de las curvas de calibración en el intervalo de tiempo de 1 a 72 horas para los métodos espectrofotométricos: **a)** fenol-sulfúrico y **b)** DNSA.

Por otro lado, antes de la optimización de la extracción asistida por ultrasonido, se realizó un estudio preliminar para evaluar la posible influencia de compuestos interferentes, tales como proteínas, lípidos y pigmentos presentes en los extractos de ulluco, sobre la determinación

espectrofotométrica de carbohidratos solubles totales (CST) y de azúcares reductores (AR) [127,128]. Para ello, se empleó el reactivo de Carrez, ampliamente utilizado para precipitar macromoléculas y reducir interferencias en los análisis espectrofotométricos [129]. Para ello, se adicionaron 100 μ L de los reactivos de Carrez I y II a la dilución final de los extractos obtenidos de las variedades amarilla y morada, preparadas bajo condiciones de extracción (etanol: agua 50 % (v/v) como solvente, temperatura de 25 °C y tiempo de extracción 30 min).

Los espectros UV-Vis de los extractos tratados y no tratados con reactivo de Carrez se presentan en la **Figura 6.10**.

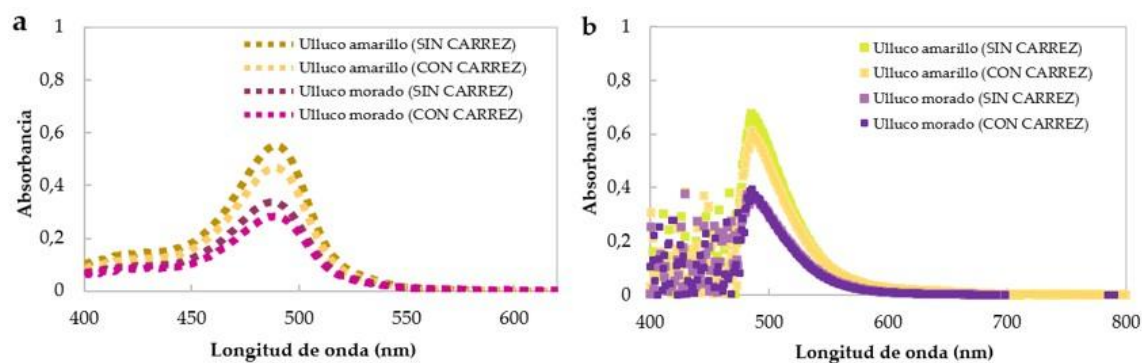


Figura 6.10 Espectros UV-Vis de los extractos de ulluco morado (U-1) y amarillo (U-4) tratados y no tratados con reactivo de Carrez para la determinación de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores.

En ambos casos, con adición y sin adición del reactivo de Carrez, los espectros de absorción mostraron perfiles similares, sin cambios apreciables en la absorbancia asociados a la eliminación de compuestos interferentes. Este comportamiento sugiere que las proteínas, los lípidos y los pigmentos presentes en los extractos no ejercen una influencia significativa sobre las determinaciones espectrofotométricas realizadas bajo las condiciones experimentales empleadas. Los resultados cuantitativos de CST y AR para ambas variedades se presentan en la **Tabla 6.10**.

Tabla 6.10 Extractos de ulluco morado (U-1) y amarillo (U-4) tratados y no tratados con reactivo de Carrez para la determinación de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores.

Variedad de ulluco	Tratamiento	Carbohidratos solubles	Azúcares reductores
		totales	
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Morado (U-1)	Sin Carrez	12 ± 1	13.1 ± 0.3
	Con Carrez	11 ± 1	12.9 ± 0.4
Amarillo (U-4)	Sin Carrez	17 ± 1	17.9 ± 0.4
	Con Carrez	16 ± 1	17.7 ± 0.3

Los resultados son expresados como g EG/100 g DW

El análisis estadístico mediante la prueba de Levene confirmó la homogeneidad de varianzas entre los grupos comparados ($p > 0.05$), permitiendo la aplicación de la prueba *t de Student*. Los resultados mostraron que la adición del reactivo de Carrez no produjo diferencias

significativas en los valores de CST ni de AR para ninguna de las variedades evaluadas ($p > 0.05$). Estos hallazgos indican que la presencia de potenciales interferentes no afecta de manera significativa la cuantificación de carbohidratos mediante los métodos espectrofotométricos utilizados, por lo que la etapa de clarificación con reactivo de Carrez no resulta necesaria para el análisis de estas muestras.

Por otra parte, al comparar ambas variedades de ulluco, se observaron diferencias significativas en el contenido de CST y azúcares reductores ($p < 0.05$), siendo la variedad amarilla la que presentó las concentraciones más elevadas. Este resultado evidencia la existencia de variabilidad composicional entre variedades, probablemente asociada a diferencias genéticas que afectan la acumulación y distribución de carbohidratos en el tubérculo. Considerando el mayor contenido de CST observado en la variedad amarilla (U-4), junto con su amplia disponibilidad y mayor aceptación comercial para consumo humano, esta variedad fue seleccionada como matriz modelo para la optimización de las condiciones de extracción asistida por ultrasonido.

En conjunto, estos resultados indican que la etapa de clarificación con reactivo de Carrez no produjo cambios significativos en la determinación de CST y AR bajo las condiciones evaluadas, por lo que no fue incorporada en el procedimiento analítico final.

6.4.2. Optimización de la extracción mediante el diseño Box-Behnken

Con el fin de optimizar la extracción de carbohidratos solubles totales (CST), expresados como g equivalentes de glucosa (EG)/100 g de peso seco (DW) liofilizado, se evaluó inicialmente el efecto individual de la composición del solvente (etanol/agua, % v/v), el tiempo de extracción (min) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) mediante un diseño unifactorial. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que los tres factores influyeron significativamente en el rendimiento de extracción de CST ($p < 0.05$), evidenciando que las condiciones de extracción afectan de manera importante la recuperación de carbohidratos solubles.

A partir de estos resultados preliminares, se definieron los niveles experimentales para el diseño de superficie de respuesta Box-Behnken: solvente (0, 10 y 20 % de etanol), tiempo (30, 60 y 90 min) y temperatura (60, 70 y 80 $^{\circ}\text{C}$), correspondientes a los niveles codificados -1, 0 y +1, respectivamente. Este diseño permitió evaluar simultáneamente los efectos lineales, cuadráticos y las posibles interacciones entre los factores, con el objetivo de maximizar la extracción de CST.

Los resultados experimentales obtenidos en los 17 ensayos del diseño Box-Behnken, junto con los valores predichos por el modelo cuadrático, se presentan en el Anexo (**Tabla 9.2**). El contenido de CST varió entre 20 y 29 g EG/100 g DW, lo que demuestra una marcada dependencia del rendimiento de extracción respecto a las condiciones experimentales evaluadas. Esta variabilidad confirma la importancia de optimizar de manera conjunta los parámetros de extracción, ya que cambios relativamente pequeños en las condiciones de operación generan diferencias significativas en la cantidad de carbohidratos recuperados.

La **Figura 6.11** presenta las superficies de respuesta tridimensionales y los diagramas de contorno generados mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM).

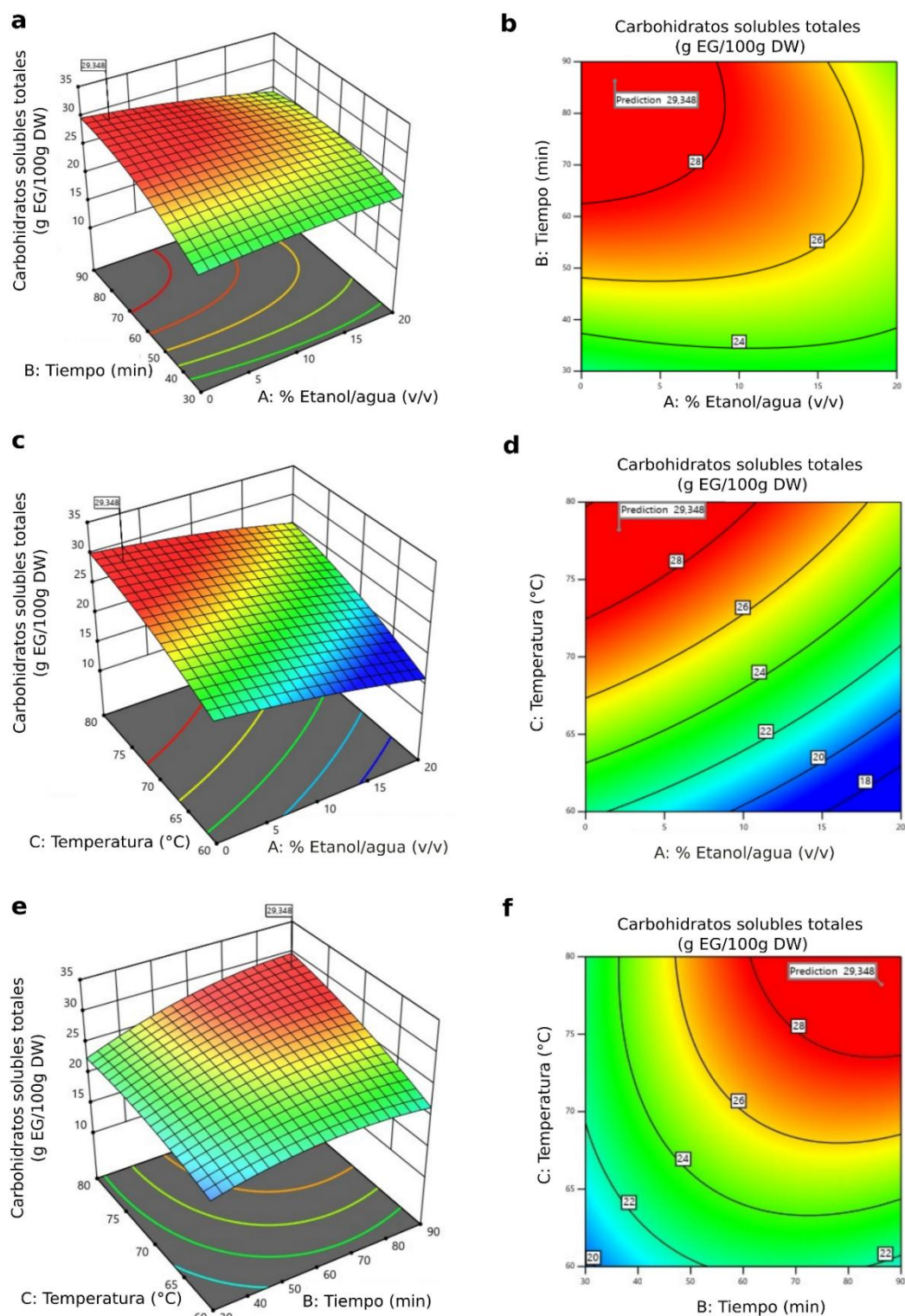


Figura 6.11 Método de Superficie Respuesta Box-Behnken y gráficos de contorno para la extracción de carbohidratos totales solubles mediante extracción asistida con ultrasonido.

Estos gráficos permiten visualizar la influencia simultánea de los factores estudiados y la magnitud de sus interacciones sobre la extracción de CST. Asimismo, la variación en la intensidad de color observada en los diagramas de contorno refleja la sensibilidad de la respuesta frente a los cambios en las condiciones de extracción. En particular, temperaturas elevadas (70–80 °C) y

bajas proporciones de etanol (0–10 %) favorecieron la extracción, incrementando el contenido de CST desde aproximadamente 26 hasta 30 g EG/100 g DW. Este comportamiento puede atribuirse al aumento de la solubilidad y difusión de los carbohidratos en el medio de extracción a temperaturas más altas, así como a la elevada polaridad de las mezclas con mayor contenido de agua, que favorece la extracción de compuestos altamente hidrofílicos como los azúcares.

De manera similar, al evaluar conjuntamente el tiempo y la temperatura, se observó que el incremento del tiempo de extracción de 60 a 90 min, combinado con temperaturas entre 70 y 80 °C, produjo un aumento en el rendimiento de CST. Este resultado sugiere que periodos de extracción más prolongados favorecen la transferencia de masa entre la matriz vegetal y el solvente, permitiendo una extracción más eficiente de los carbohidratos solubles. Sin embargo, el efecto del tiempo fue más evidente a temperaturas elevadas, lo que indica la existencia de una interacción positiva entre ambos factores.

Los resultados del ANOVA para el diseño Box-Behnken (**Tabla 6.11**) mostraron que el modelo cuadrático propuesto fue altamente significativo ($p < 0.0001$). El R^2 fue de 0.9812, lo que significa que solo el 2% de la variación no fue explicada por el modelo polinómico para los CST. La falta de ajuste no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$), lo que confirma su capacidad para describir adecuadamente la relación entre las variables experimentales y la respuesta estudiada.

Tabla 6.11 Análisis de varianza del diseño experimental Box-Behnken.

Variable	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	Valor-F	Valor – p	Significancia
Model	134.05	9	14.89	40.49	< 0.0001	**
A-Solvente	16.50	1	16.50	44.86	0.0003	**
B-Tiempo	9.72	1	9.72	26.43	0.0013	**
C-Temperatura	74.12	1	74.12	201.46	< 0.0001	**
AB	8.56	1	8.56	23.26	0.0019	**
AC	0.45	1	0.45	1.22	0.3058	*
BC	7.26	1	7.26	19.74	0.0030	**
A ²	1.13	1	1.13	3.07	0.1235	*
B ²	11.26	1	11.26	30.60	0.0009	**
C ²	3.62	1	3.62	9.85	0.0164	**
Residual	2.58	7	0.37			
Lack-of-fit	1.79	3	0.60	3.06	0.1543	*
Pure Error	0.78	4	0.20			
Cor Total	136.62	16				
R² = 0.9812		R² Adjust = 0.9569		RSD = 2.6 %		

(**): Valores significativos ($p < 0.05$); (*): Valores no significativos; G.L.: Grados de libertad

Ecuación cuadrática polinomial predictiva:

$$Y = -31.10500 + 0.017875A - 0.010917B + 1.29987C - 0.004875 A*B + 0.003350 A*C + 0.004492 B*C - 0.005175 A^2 - 0.001817B^2 - 0.009275 C^2$$

El valor predictivo para los carbohidratos solubles totales fue de 29.4 ± 0.6 g/100 g DW a una temperatura de 78 °C y un tiempo de 86 min, utilizando una concentración de etanol/agua al 2.1 % (v/v).

La significancia estadística del modelo demuestra que las variaciones observadas en el contenido de CST pueden explicarse por los factores evaluados y sus interacciones, validando el uso de la metodología de superficie de respuesta como una herramienta eficaz para la optimización del proceso de extracción.

6.4.2.1. Verificación del modelo predictivo

Para la verificación del modelo predictivo, se adoptaron las condiciones óptimas predichas por el diseño de superficie de respuesta para lograr la máxima extracción de carbohidratos solubles en tres réplicas de experimentos: extracción con solvente (etanol/agua al 2 %, v/v), tiempo (86 min) y temperatura (78 °C). El resultado experimental para CST fue de 29.7 ± 0.9 g/100 g DW para la muestra de ulluco amarillo (U-4). La concordancia entre el valor experimental y el valor predicho respalda la aplicabilidad del modelo Box-Behnken para optimizar la extracción asistida por ultrasonido de CST en la muestra evaluada.

6.4.3. Resultados de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores en cinco variedades de ulluco

Los contenidos de carbohidratos solubles totales (CST) y de azúcares reductores (AR) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades de ulluco analizadas ($p < 0.05$), como se muestra en la **Tabla 6.12**.

Tabla 6.12 Contenido de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores en las cinco variedades de *Ullucus tuberosus*.

Código	Variedad de ulluco	Carbohidratos solubles totales (CST)	Azúcares reductores (AR)
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
U-1	Morado	27 ± 2^a	15.8 ± 0.1^a
U-2	Morado-naranja	39 ± 3^c	24.0 ± 0.5^d
U-3	Naranja-amarillo	36 ± 2^c	21.7 ± 0.3^c
U-4	Amarillo	$31 \pm 2^{a,b}$	21 ± 1^b
U-5	Amarillo-verde	32 ± 2^b	$21.2 \pm 0.3^{b,c}$

Los resultados son expresados en g equivalentes de glucosa (EG)/100 g DW; s: desviación estándar; n=3; Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las distintas variedades de ulluco.

Los valores de CST oscilaron entre 27 ± 2 y 39 ± 3 g EG/100 g DW, mientras que los AR variaron entre 15.8 ± 0.1 y 24.0 ± 0.5 g EG/100 g DW. En general, las variedades con mayores contenidos de CST también presentaron mayores concentraciones de AR, lo que indica que una fracción importante de los carbohidratos solubles está constituida por azúcares con capacidad reductora.

Entre las variedades evaluadas, el ulluco morado (U-1) presentó los menores contenidos de CST y AR. En contraste, las variedades morado-naranja (U-2) y naranja-amarillo (U-3) mostraron los mayores valores de CST, mientras que U-2 presentó el mayor contenido de AR.

Estas diferencias evidencian variabilidad composicional entre variedades, aunque no permiten establecer por sí solas una explicación fisiológica sobre la acumulación de carbohidratos en el tubérculo. Por el contrario, la variedad amarilla (U-4) y las que exhiben diferentes intensidades de pigmentación intermedias presentaron concentraciones más elevadas de carbohidratos, evidenciando una mayor capacidad de almacenamiento de carbohidratos solubles.

Los valores de CST obtenidos en este estudio fueron inferiores a los reportados por Pacheco et al. [13], quienes informaron un contenido de 83 g/100 g DW de carbohidratos totales para la variedad amarillo-rosada de ulluco empleando el método fenol-sulfúrico. Esta diferencia puede atribuirse a las metodologías de extracción y cuantificación empleadas para la determinación de carbohidratos, la fracción de carbohidratos analizada, la variedad del tubérculo, las condiciones de cultivo, el estado de madurez, las condiciones de almacenamiento, entre otros, las cuales pueden contribuir a las discrepancias observadas entre estudios.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer estudio que compara el contenido de carbohidratos solubles totales y de azúcares reductores en diferentes variedades de ulluco utilizando una extracción asistida por ultrasonido previamente optimizada y métodos espectrofotométricos validados. En este sentido, los resultados obtenidos aportan información novedosa sobre la variabilidad composicional de los carbohidratos en este cultivo andino y constituyen una base para futuras investigaciones orientadas a comprender la relación entre el perfil de carbohidratos, las características varietales y la calidad nutricional del tubérculo.

6.5. Objetivo específico 5: Identificación de azúcares por GC/MS y cuantificación por HPLC-ELSD

6.5.1. Identificación de azúcares por GC/MS

Los azúcares solubles fueron identificados mediante la comparación de sus tiempos de retención y espectros de masas con los correspondientes estándares comerciales, complementada con información reportada en la literatura. Los cromatogramas de iones totales (TIC) revelaron señales analíticas entre 22 y 38 min, las cuales fueron asignadas a glucosa, fructosa y sacarosa en todos los extractos de ulluco analizados, como se muestra en la **Figura 6.12**.

La glucosa y la fructosa fueron los azúcares predominantes, evidenciando mayores intensidades de señal en comparación con la sacarosa, cuya abundancia relativa fue considerablemente menor. Asimismo, en todas las muestras se detectaron múltiples señales asociadas a las formas anoméricas de estos monosacáridos, incluyendo D-(-)-fructopiranos, α -D-glucopiranos y β -D-glucopiranos. La presencia de estos múltiples peaks se atribuye a la formación de diferentes derivados trimetilsililados durante el proceso de derivatización, el cual es ampliamente descrito para el análisis cromatográfico de carbohidratos [130,131].

Según el espectro de masas (MS) de los derivados de TMS de estos carbohidratos solubles, se observa un perfil de fragmentación característico en la **Tabla 6.13**. Por ejemplo, los fragmentos m/z 73, 147, 204 y 217 son relativamente comunes en el MS de las señales analíticas de las muestras de ulluco.

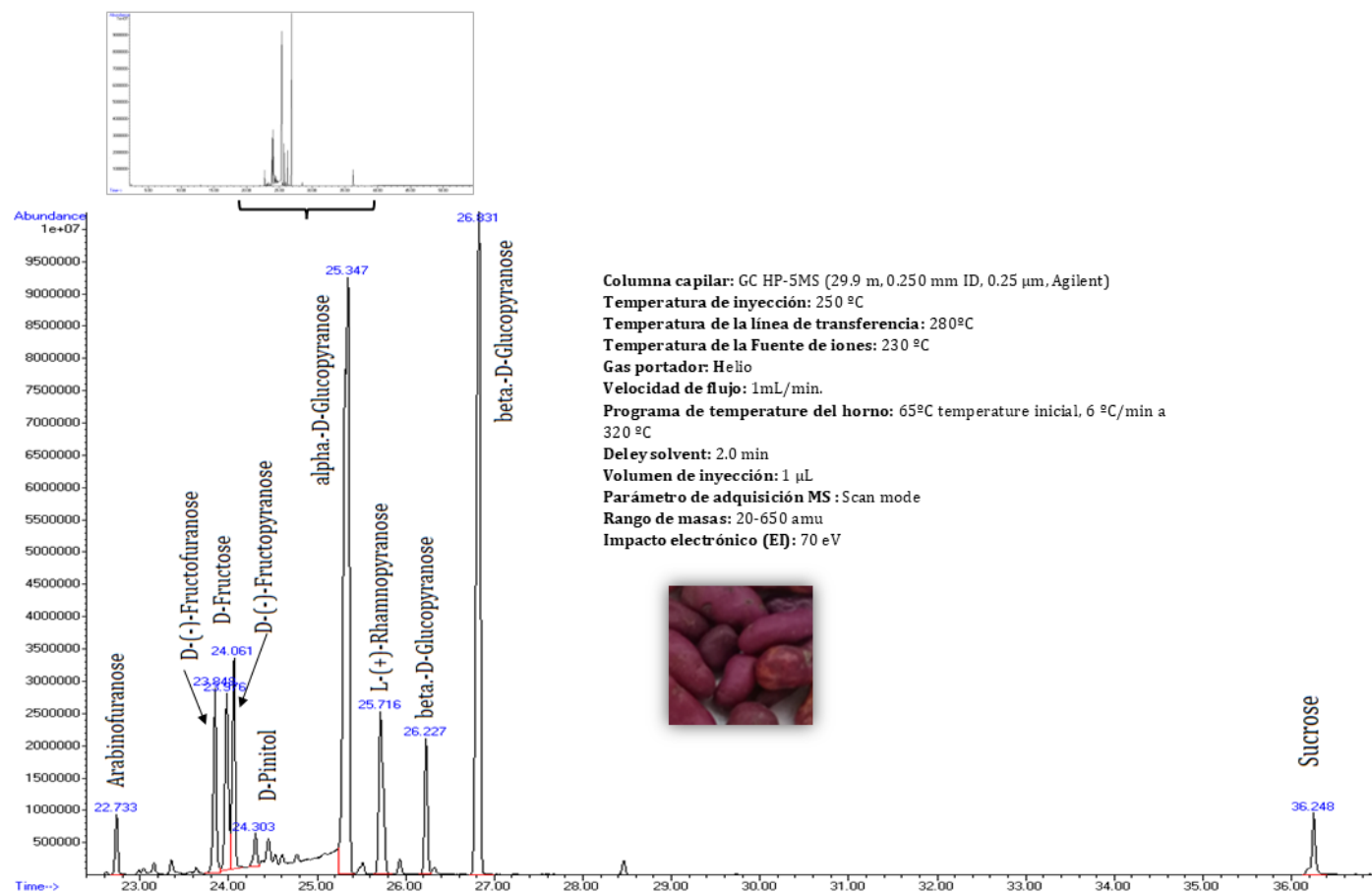


Figura 6.12 Cromatograma de iones totales (TIC, Total Ion Chromatogram) del extracto de ulluco morado (U-1) analizado por GC/MS: Principales azúcares identificados, glucosa, fructosa y sacarosa.

Tabla 6.13 Identificación de azúcares por GC/MS en cinco variedades de *Ullucus tuberosus*

	Identificación de azúcares	tr	Iones	Variedades de ulluco				
		min	m/z	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5
1	Xilopiranososa	23.0	217(100) , 73(38.63), 147(13)	✓	nd	✓	nd	nd
2	D-(-) Fructofuranosa-5TMS	23.8	217(100) , 73(66), 147(31), 437 (27), 218(24)	✓	✓	✓	✓	✓
3	D- Fructosa-5TMS	24.0	217(100) , 73(66), 147(31), 437 (27), 218(24)	✓	✓	✓	✓	✓
4	D-(-)-Fructopiranososa-5TMS	24.1	204(100) , 73(65), 437(61), 147(35)	✓	✓	✓	✓	✓
5	Arabinofuranosa	24.5	217(100) , 73(51), 147(21), 437	nd	nd	nd	nd	✓
6	α -D-Glucopiranososa-5TMS	25.3	204(100) , 73(62), 147(39), 435	✓	✓	✓	✓	✓
7	Beta-D-Glucopiranososa-5TMS	25.7	204(100) , 73(47),147	✓	✓	✓	✓	✓
8	Beta-D-Glucopiranososa-5TMS	26.2	204 (100) , 73 (47), 147	✓	✓	✓	✓	✓
9	Beta-D-Glucopiranososa-5TMS	26.8	204(100) , 73(68), 147(42), 435	✓	✓	✓	✓	✓
10	Sacarosa	36.2	361(100) , 73(36), 217(35), 437(21)	✓	✓	✓	✓	✓

U-1: Ulluco morado; U-2: Ulluco morado-naranja; U-3: Ulluco naranja-amarillo; U-4: Ulluco amarillo; U-5: Ulluco amarillo-verde; tr: tiempo de retención; nd: no detectado; (✓) detectado

El fragmento en m/z 73 representa el derivado trimetilsilil $[(CH_3)_3Si]^+$, el fragmento m/z 204 $[TMSO-CH=CH-OTMS]$ y 147 $[(CH_3)_2-Si=O-TMS]^+$ corresponden a derivados de piranosa que pueden formarse a partir de m/z 437 $[(TMSO)_4C_5H_5O]^+$, el fragmento m/z 217 $[TMSO-CH=CH-OTMS]^+$ es característico de monosacáridos con anillo de furanosa, y un peak intenso en m/z 361 $[(OTMS)_3C_6H_6O]^+$ es consistente con las estructuras de piranosa y furanosa, y baja intensidad en m/z 437, 217, 204 y 73 correspondiente a sacarosa [131]. Este perfil de identificación mostró los principales azúcares, como fructosa, glucosa y sacarosa, de las variedades de ulluco, lo cual concuerda con la investigación de Pacheco et al. [13], quienes determinaron estos azúcares en la variedad de ulluco amarillo-rosa mediante GC-FID. De acuerdo con los antecedentes revisados, este estudio constituye uno de los primeros reportes de identificación de azúcares solubles por GC/MS en variedades de ulluco.

6.5.2. Optimización de las condiciones cromatográficas HPLC-ELSD

La optimización de las condiciones cromatográficas se realizó mediante un diseño unifactorial utilizando una solución madre de una mezcla de arabinosa, xilosa, ramnosa, glucosa, fructosa y sacarosa. Las condiciones óptimas de separación correspondieron a una elución isocrática con acetonitrilo:agua (85:15, v/v), un flujo de 1 mL/min y una temperatura de columna de 25 °C, logrando una resolución superior a 1.5 para todos los azúcares. Los cromatogramas representativos de la mezcla de estándares y de la muestra de ulluco amarillo (U-4) se presentan en la **Figura 6.13**.

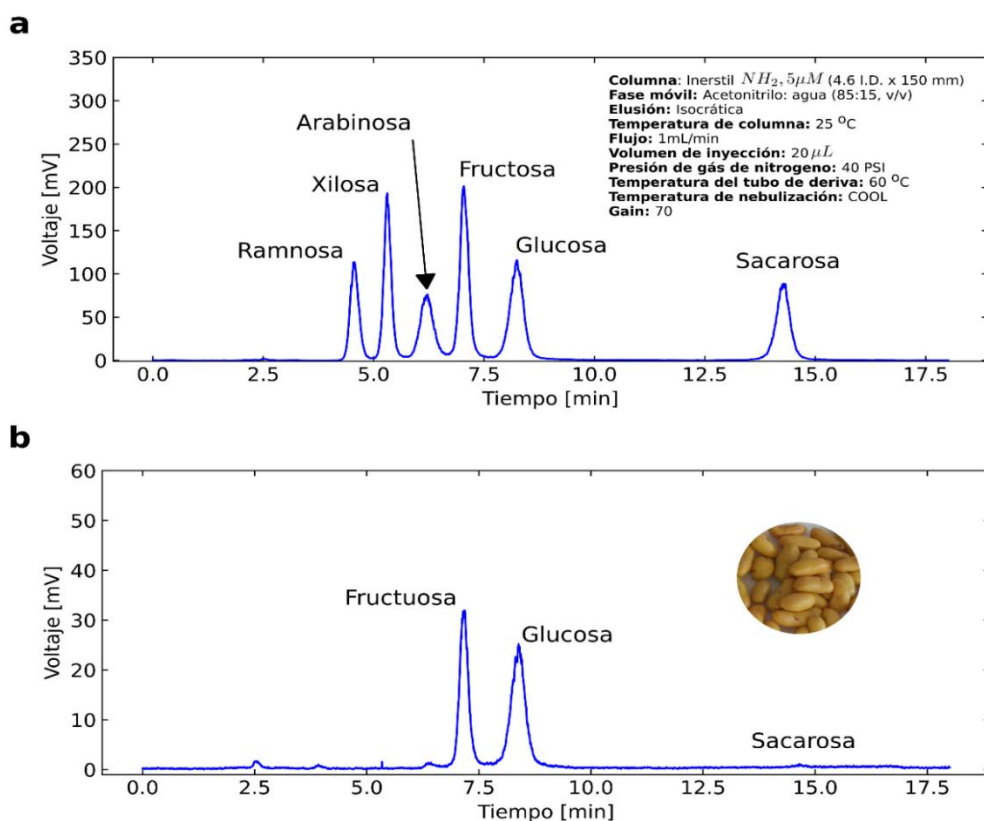


Figura 6.13 Cromatogramas representativos de azúcares usando HPLC-ELSD: **a)** Separación simultánea de una mezcla de estándares de ramnosa, xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa y sacarosa; **b)** Cromatograma representativo de azúcares presentes en la muestra de ulluco amarillo (U-4).

Se observó que el incremento del contenido de agua en la fase móvil reduce la resolución de ramnosa, xilosa y arabinosa ($R_s < 1.5$), mientras que mayores proporciones de acetonitrilo aumentaron la retención y mejoraron la separación. Por otra parte, el aumento de la temperatura de la columna a 30°C o 35°C produjo una elevación de la línea base y una disminución significativa de las áreas de los picos correspondientes a arabinosa, xilosa y ramnosa.

Para el detector ELSD, se evaluaron los parámetros que afectan la respuesta analítica, incluyendo la temperatura del tubo de deriva, la presión del gas nebulizador y la ganancia. Las condiciones óptimas fueron una temperatura de deriva de 60 °C, una presión de nitrógeno de 40 psi y una gain de 70. Bajo estas condiciones se obtuvo la máxima intensidad de señal y un bajo nivel de ruido de fondo, favoreciendo la evaporación eficiente de la fase móvil. Temperaturas del tubo de deriva de 70 °C y 80 °C provocaron una disminución progresiva de la respuesta analítica, particularmente en arabinosa, ramnosa, xilosa, fructosa y glucosa, lo que evidencia una mayor sensibilidad de estos compuestos a las condiciones de evaporación en comparación con la sacarosa.

En las condiciones optimizadas, los seis azúcares fueron separados e identificados mediante la comparación de sus tiempos de retención: ramnosa (4.6 min), xilosa (5.3 min), arabinosa (6.2 min), fructosa (7.0 min), glucosa (8.2 min) y sacarosa (14.3 min). La mayor retención de la sacarosa puede atribuirse a su elevado número de grupos hidroxilo, que favorece interacciones más intensas con los grupos amino de la fase estacionaria. Asimismo, las diferencias en la disposición espacial de los grupos hidroxilo influyen en el comportamiento cromatográfico de los monosacáridos, permitiendo la separación de compuestos estructuralmente similares como xilosa, arabinosa, fructosa y glucosa.

6.5.3. Parámetros analíticos del método cromatográfico

Se construyeron curvas de calibración mediante el método de estándar externo en un rango de concentración de 50 a 700 mg/L para los seis azúcares analizados. En la **tabla 6.14** se presentan los parámetros analíticos del método cromatográfico HPLC-ELSD.

Aunque el detector ELSD presenta una respuesta intrínsecamente no lineal, que suele describirse mediante funciones potenciales, las curvas obtenidas mostraron una adecuada relación lineal en el intervalo evaluado, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.9822 para todos los analitos. Estos resultados indican que el rango de trabajo seleccionado es apropiado para la cuantificación simultánea de azúcares, garantizando una respuesta analítica lo suficientemente confiable para fines cuantitativos.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon a partir del error estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente de las curvas de calibración. Los valores de LOD variaron entre 56 y 90 mg/L, mientras que los LOQ oscilaron entre 189 y 302 mg/L. Estos resultados fueron coherentes con las observaciones experimentales, ya que a concentraciones inferiores a 50 mg/L las señales analíticas se aproximaron a la línea base, dificultando la diferenciación entre la señal del analito y el ruido instrumental. Por encima de esta concentración, se observó un incremento claramente detectable de la respuesta analítica para glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa y ramnosa, mientras que la arabinosa presentó una menor intensidad de señal.

Esta respuesta diferencial indica una menor sensibilidad del detector hacia la arabinosa, lo que contribuye a los mayores límites de detección y cuantificación observados para este compuesto.

Tabla 6.14 Parámetros analíticos del método cromatográfico HPLC-ELSD para la determinación de azúcares.

Parámetros analíticos	Ramnosa	Xilosa	Arabinosa	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Pendiente	2.775 ± 0.142	3.933 ± 0.148	2.463 ± 0.148	4.705 ± 0.158	4.081 ± 0.172	3.688 ± 0.163
Intercepto	-316 ± 55	-253 ± 53	-136 ± 53	-231 ± 66	-195 ± 62	-224 ± 58
R ²	0.9896	0.9929	0.9822	0.9932	0.9911	0.9903
Rango lineal	50 - 600	50 - 600	50 - 600	50 - 700	50 - 600	50 - 600
Rango de trabajo	64 - 600	189 - 600	302 - 600	210 - 700	212 - 600	222 - 600
LOD (mg/L)	64	56	90	63	64	66
LOQ (mg/L)	214	189	302	210	212	222
Repetibilidad (n=6)	2.8 %	3.9 %	2.4 %	4.1 %	5.2 %	5.2 %
Precision intermedia (n=9)	3.1 %	4.6 %	2.8 %	6.5 %	6.3 %	6.4%

R²: Coeficiente de determinación; LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación

Los valores de LODs y LOQs obtenidos fueron superiores a los reportados en algunos estudios que emplean HPLC-ELSD para cuantificar azúcares en alimentos [132–134]. Sin embargo, estos valores deben interpretarse en función del rango de concentración seleccionado y de las características propias del ELSD. Si bien la sensibilidad se incrementa utilizando curvas de calibración bajas entre 10 y 100 mg/L, esta estrategia reduce la linealidad al priorizar estas concentraciones, generando una respuesta curva incompatible con un modelo lineal único. En consecuencia, la selección del intervalo de 50 a 700 mg/L representó un compromiso adecuado entre sensibilidad y capacidad de cuantificación, permitiendo cubrir las concentraciones habitualmente encontradas en matrices vegetales sin necesidad de emplear modelos de calibración independientes para rangos bajos y altos de concentración.

La precisión y exactitud del método fueron satisfactorias, como se evidenció a través de los estudios de repetibilidad y recuperación (**Tabla 6.15**).

Tabla 6.15 % de recuperación de seis azúcares para el método cromatográfico HPLC-ELSD en la muestra de ulluco amarillo (U-4).

Azúcares	Recuperación (%) con adición en las muestras (n=3)		
	15 mg	20 mg	30 mg
Ramnosa	105 ± 2	91 ± 4	84 ± 3
Xilosa	102 ± 3	87 ± 3	82 ± 3
Arabinosa	90 ± 1	83 ± 4	85 ± 4
Fructosa	95 ± 3	97 ± 6	112 ± 6
Glucosa	88 ± 4	94 ± 6	106 ± 5
Sacarosa	47 ± 5	56 ± 3	60 ± 6

Los porcentajes de recuperación obtenidos confirman un desempeño adecuado para ramnosa, xilosa, arabinosa, fructosa y glucosa, con recuperaciones comprendidas dentro de rangos aceptables y baja variabilidad entre réplicas. En cambio, la sacarosa presentó recuperaciones considerablemente menores, entre 47 % y 60 %, que pueden atribuirse a una limitación metodológica ligada al proceso de extracción o a la respuesta del detector, asociada al tamaño de las partículas nebulizadas, generando la dispersión de la luz de forma errática. Aunque la recuperación de la sacarosa ha sido bajo, se ha descrito que porcentajes de recuperación entre 50% y 120% acompañado de RSD < 15% son aceptables para la cuantificación [82]. En consecuencia, los resultados de sacarosa pueden utilizarse con fines comparativos entre variedades, pero no deben discutirse con el mismo nivel de confiabilidad que los obtenidos para glucosa y fructosa.

6.5.4. Resultados de cuantificación de carbohidratos por HPLC-ELSD

El método HPLC-ESLD desarrollado se aplicó a la determinación de azúcares solubles en las cinco muestras de *Ullucus tuberosus*. En todos los extractos se identificaron glucosa, fructosa y sacarosa como los principales azúcares solubles, como se muestra en la **Tabla 6.16**. En contraste, la ramnosa, xilosa y arabinosa no fueron detectadas en ninguna de las variedades, lo que sugiere que, bajo las condiciones analíticas empleadas, estos monosacáridos no fueron detectados como azúcares libres o se encontraron por debajo de los límites de detección del método.

Tabla 6.16 Azúcares solubles determinados por HPLC-ELSD en cinco variedades de *Ullucus tuberosus*

N°	Azúcar	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
1	Ramnosa	ND	ND	ND	ND	ND
2	Xilosa	ND	ND	ND	ND	ND
3	Arabinosa	ND	ND	ND	ND	ND
4	Fructosa	6.7 ± 0.3 ^a	7.0 ± 0.1 ^{a,b}	7.5 ± 0.3 ^b	7.6 ± 0.5 ^b	8.4 ± 0.1 ^c
5	Glucosa	5.9 ± 0.3 ^a	9.2 ± 0.4 ^b	9.4 ± 0.1 ^b	9.5 ± 0.3 ^b	10.4 ± 0.3 ^c
6	Sacarosa	1.67 ± 0.04 ^a	3.24 ± 0.03 ^{b,c}	3.33 ± 0.05 ^c	3.16 ± 0.07 ^b	3.15 ± 0.05 ^b

Los resultados son expresados en g/100 g DW (peso seco) liofilizado; ND: No detectado; U-1: Ulluco morado; U-2: Ulluco morado-naranja; U-3: Ulluco naranja-amarillo; U-4: Ulluco amarillo; U-5: Ulluco amarillo-verde. Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las distintas variedades de ulluco.

El análisis estadístico mediante la prueba de Duncan reveló diferencias significativas entre las variedades evaluadas ($p < 0.05$). La variedad de ulluco morado (U-1) presentó los menores contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa, mientras que la variedad amarillo-verde (U-5) exhibió concentraciones más elevadas de glucosa y fructosa. Independientemente de la variedad, la sacarosa fue consistentemente el azúcar menos abundante, representando una proporción considerablemente menor que los monosacáridos predominantes.

El predominio de glucosa y fructosa sobre la sacarosa podría estar asociado a procesos de hidrólisis de sacarosa durante el desarrollo fisiológico del tubérculo o a diferencias en la actividad

de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos. Asimismo, las diferencias observadas entre variedades sugieren la influencia de factores genéticos sobre la acumulación y distribución de los azúcares solubles.

Los contenidos de glucosa y fructosa determinados mediante HPLC-ELSD fueron comparables a los reportados por Pacheco et al. [38], quienes emplearon GC-FID para la cuantificación de azúcares solubles en el ulluco amarillo-rosa. De manera similar, Gross, et al. [19] reportaron concentraciones de glucosa, fructosa y de sacarosa mediante HPLC-IR para este tubérculo cercanos a los valores obtenidos en este estudio. Aunque existen diferencias cuantitativas entre estudios, atribuibles a la variedad analizada, las metodologías empleadas, y posiblemente a las condiciones de cultivo, todos los resultados coinciden en identificar a la glucosa, la fructosa y la sacarosa como los principales azúcares solubles presentes en los tubérculos de ulluco. Estos hallazgos confirman que la composición de azúcares libres del ulluco está dominada por monosacáridos, los cuales podrían contribuir significativamente a las características sensoriales y al valor nutricional de este cultivo andino.

7. Capítulo: Conclusiones

La presente investigación desarrolló e integró diferentes estrategias analíticas para la caracterización de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales en variedades de ulluco (*Ullucus tuberosus*), combinando procedimientos de preparación de muestra, métodos espectrofotométricos y técnicas cromatográficas. Este enfoque permitió generar información complementaria sobre la composición química de una matriz vegetal compleja y contribuir al desarrollo de metodologías analíticas aplicables al estudio de tubérculos andinos subutilizados.

El análisis proximal y mineral permitió establecer una caracterización composicional inicial de las cinco variedades de ulluco. En general, las muestras presentaron perfiles relativamente similares en cenizas, proteínas y contenido mineral, con variaciones puntuales entre variedades. El potasio fue el mineral mayoritario en todas las muestras, seguido por magnesio, calcio, sodio, hierro, zinc y cobre. Estos resultados proporcionan una base composicional para contextualizar la matriz estudiada y apoyar la interpretación de los resultados posteriores de compuestos fenólicos y carbohidratos no estructurales.

La integración de métodos espectrofotométricos UV/Vis y técnicas cromatográficas permitió obtener información global y específica sobre los analitos estudiados. Los métodos UV/Vis fueron adecuados para la estimación del contenido fenólico total, actividad antioxidante, carbohidratos solubles totales y azúcares reductores, mientras que las técnicas cromatográficas permitieron avanzar hacia la identificación y cuantificación de compuestos individuales con mayor selectividad.

Para los compuestos fenólicos, la extracción asistida por ultrasonido permitió establecer condiciones adecuadas para la recuperación de compuestos fenólicos desde la matriz de ulluco. La cuantificación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante evidenciaron diferencias significativas entre variedades. En general, las variedades con coloración morada, naranja o mixta presentaron mayores valores de CFT y AA que la variedad amarilla. Esta tendencia sugiere una posible relación entre la pigmentación del tubérculo y el contenido fenólico; sin embargo, el color no debe interpretarse como un indicador directo de la actividad antioxidante, debido a que otros componentes de la matriz, como las betalainas, también pueden contribuir a la pigmentación y a la respuesta observada.

El análisis por UHPLC-ESI-MS/MS permitió identificar trece compuestos fenólicos de referencia y cuantificar de manera confiable cuatro flavonoides glicosilados: rutina, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido e isorhamnetina-3-rutinósido. Los demás compuestos evaluados fueron detectados en baja concentración, no detectados o considerados de cuantificación tentativa, de acuerdo con el desempeño analítico observado. De acuerdo con los antecedentes revisados, la presencia de quercetina-3-glucósido no ha sido reportada previamente de manera específica en variedades de ulluco. Estos resultados amplían el conocimiento disponible sobre la composición fenólica del ulluco y evidencian diferencias entre variedades en el contenido de flavonoides glicosilados.

Para los carbohidratos no estructurales, la optimización de la extracción asistida por ultrasonido mediante metodología de superficie de respuesta permitió establecer condiciones

experimentales adecuadas para la determinación de carbohidratos solubles totales. El análisis unifactorial y el diseño Box-Behnken demostraron que la composición del solvente, la temperatura y el tiempo de extracción influyen significativamente en el rendimiento de extracción. El modelo cuadrático obtenido fue estadísticamente significativo y permitió seleccionar condiciones de extracción adecuadas para la determinación de CST en la muestra evaluada.

Los contenidos de carbohidratos solubles totales oscilaron entre 27 y 39 g EG/100 DW, mientras que los azúcares reductores variaron entre 15.8 y 24.0 g EG/100 g DW. Estos resultados evidenciaron variabilidad composicional entre las variedades estudiadas. El método HPLC-ELSD permitió la separación simultánea de seis azúcares estándar y la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en las variedades analizadas. Ramnosa, xilosa y arabinosa no fueron detectadas bajo las condiciones analíticas empleadas. La glucosa y la fructosa fueron los azúcares predominantes en todas las variedades, seguidas por la sacarosa; sin embargo, los resultados de sacarosa deben interpretarse con cautela debido a las recuperaciones más bajas obtenidas para este analito. Complementariamente, GC/MS permitió confirmar cualitativamente la presencia de los principales azúcares solubles en los extractos derivatizados.

Desde la perspectiva de la Química Analítica, uno de los principales aportes de esta tesis fue la integración de estrategias de extracción, validación y detección complementaria para abordar la complejidad del *Ullucus tuberosus* como matriz vegetal. Los métodos espectrofotométricos permitieron obtener parámetros globales de CFT, AA, CST y AR, mientras que UHPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ELSD y GC/MS aportaron información específica sobre compuestos fenólicos y azúcares solubles. Esta integración permitió fortalecer la confiabilidad de la caracterización química realizada, aunque algunos analitos deben interpretarse como tentativos o con cautela según el desempeño analítico observado.

En conjunto, esta tesis aporta información analítica relevante sobre la composición proximal, mineral, fenólica y de carbohidratos no estructurales de cinco variedades de ulluco comercializadas en Chile. Los resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la composición química de este tubérculo andino y entregan antecedentes para su revalorización desde una perspectiva nutricional, fitoquímica y analítica. Futuras investigaciones podrían profundizar en la relación entre composición química, procesamiento, estabilidad y potencial alimentario de las distintas variedades de ulluco, así como explorar la integración de métodos analíticos no destructivos para evaluar atributos externos, como el color, y su posible relación con la composición fenólica.

8. Referencias

1. André, C.M.; Oufir, M.; Hoffmann, L.; Hausman, J.F.; Rogez, H.; Larondelle, Y.; Evers, D. 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* **2009**, *22*, 517–524, doi:10.1016/J.JFCA.2008.11.010.
2. Bach, S.; Yada, R.Y.; Bizimungu, B.; Fan, M.; Sullivan, J.A. Genotype by Environment Interaction Effects on Starch Content and Digestibility in Potato (*Solanum Tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3941–3948, doi:10.1021/JF3030216.
3. Zheng, X.; Jitsuyama, Y.; Terauchi, T.; Iwama, K. Effects of Drought and Shading on Non-Structural Carbohydrate Stored in the Stem of Potato (*Solanum Tuberosum* L.). *Plant Prod. Sci.* **2009**, *12*, 449–452, doi:10.1626/PPS.12.449.
4. Montes-Lora, S.; Hurtado, N.; Mosquera, N.; Heredia, F.J.; Cejudo-Bastante, M.J. Effect of Technological Practices on Individual Betalains and Antioxidant Activity of Columbian Betalain-Rich Raw Materials. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 1041–1047, doi:10.1111/IJFS.13056.
5. Dramićanin, A.; Andrić, F.; Mutić, J.; Stanković, V.; Momirović, N.; Milojković-Opšenica, D. Content and Distribution of Major and Trace Elements as a Tool to Assess the Genotypes, Harvesting Time, and Cultivation Systems of Potato. *Food Chem.* **2021**, *354*, 129507, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.129507.
6. Castañeta, G.; Miranda-Flores, D.; Bascopé, M.; Peñarrieta, J.M. Characterization of Carotenoids, Proximal Analysis, Phenolic Compounds, Anthocyanidins and Antioxidant Capacity of an Underutilized Tuber (*Tropaeolum Tuberosum*) from Bolivia. *Discover Food* **2024**, *4*, 9-, doi:10.1007/S44187-024-00078-8.
7. Espín, S.; Villacrés, E.; Brito, B. Caracterización Físico-Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos. In *Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*; 2004; pp. 91–116 ISBN 92-9060-231-7.
8. Rousi, A.; Jokela, P.; Kalliola, R.; Pietilä, L.; Salo, J.; Yli-Rekola, M. Morphological Variation among Clones of Ulluco (*Ullucus Tuberosus*, Basellaceae) Collected in Southern Peru. *Economic Botany* **1989**, *43*, 58–72, doi:10.1007/BF02859325.
9. Malice, M.; Baudoin, J.-P. Genetic Diversity and Germplasm Conservation of Three Minor Andean Tuber Crop Species. *Biotechnology Agronomy, Society and Environment* **2009**, *13*, 441–448.
10. Vinos, C.; Nieto, C.; Rivera, M. *EL MELLOCO Características, Técnicas de Cultivo y Potencial En Ecuador*; Quito-Ecuador, 1993;
11. Gómez-Villanes, N.; Girón-Aguilar, R.; Aquino-Zacarías, V.; Monteghirfo-Gomero, M.; Custodio, M.; Ortega-Quispe, K.; Ccopi-Trucios, D.; Pizarro-Carcausto, S. Evaluation of the Protein Content and Variability of Olluco (*Ullucus Tuberosus* Caldas): Implications for

- Its Revaluation as an Andean Food of High Nutritional Value. *The Scientific World Journal* **2025**, 2025, 9075681, doi:10.1155/TSWJ/9075681.
12. Busch, J.M.; Sangketkit, C.; Savage, G.P.; Martin, R.J.; Halloy, S.; Deo, B. Nutritional Analysis and Sensory Evaluation of Ulluco (*Ullucus Tuberosus* Loz) Grown in New Zealand. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 2232–2240, doi:10.1002/1097-0010.
 13. Pacheco, M.T.; Hernández-Hernández, O.; Moreno, F.J.; Villamiel, M. Andean Tubers Grown in Ecuador: New Sources of Functional Ingredients. *Food Biosci.* **2020**, 35, 100601, doi:10.1016/J.FBIO.2020.100601.
 14. Pacheco, M.T.; Escribano-Bailón, M.T.; Moreno, F.J.; Villamiel, M.; Dueñas, M. Determination by HPLC-DAD-ESI/MSn of Phenolic Compounds in Andean Tubers Grown in Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis* **2019**, 84, 103258, doi:10.1016/J.JFCA.2019.103258.
 15. Sanchez-Portillo, S.; Del, M.; Salazar-Sánchez, R.; Campos-Muzquiz, L.G.; Ascacio-Valdés, J.A.; Fernando Solanilla-Duque, J.; Lopez Badillo, C.M.; Flores-Gallegos, A.C.; Rodríguez-Herrera, R. Exploration of Foods and Foodomics Proximal Characteristics, Phenolic Compounds Profile, and Functional Properties of *Ullucus Tuberosus* and *Arracacia Xanthorrhiza*, doi:10.37349/eff.2024.00058.
 16. Mosquera, N.; Cejudo-Bastante, M.J.; Heredia, F.J.; Hurtado, N. Identification of New Betalains in Separated Betacyanin and Betaxanthin Fractions from Ulluco (*Ullucus Tuberosus* Caldas) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Plant Foods for Human Nutrition* 2020 75:3 **2020**, 75, 434–440, doi:10.1007/S11130-020-00837-9.
 17. Svenson, J.; Smallfield, B.M.; Joyce, N.I.; Sansom, C.E.; Perry, N.B. Betalains in Red and Yellow Varieties of the Andean Tuber Crop Ulluco (*Ullucus Tuberosus*). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 7730–7737, doi:10.1021/JF8012053.
 18. Espada, A.; Jiménez, C.; Dopeso, J.; Riguera, R. Tuberosides A, B, and C, Novel Triterpenoid Saponins from the Hypoglucaemic Fraction of *Ullucus Tuberosus*. *Liebigs Annalen* **1996**, 1996, 781–784, doi:10.1002/JLAC.199619960523;WGROU:STRING:PUBLICATION.
 19. Gross, R.; Koch, F.; Malaga, I.; de Miranda, A.F.; Schoeneberger, H.; Trugo, L.C. Chemical Composition and Protein Quality of Some Local Andean Food Sources. *Food Chem.* **1989**, 34, 25–34, doi:10.1016/0308-8146(89)90030-7.
 20. Pérez-Balladares, D.; Castañeda-Terán, M.; Granda-Albuja, M.G.; Tejera, E.; Iturralde, G.; Granda-Albuja, S.; Jaramillo-Vivanco, T.; Giampieri, F.; Battino, M.; Alvarez-Suarez, J.M. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Main Fruits, Tubers and Legumes Traditionally Consumed in the Andean Regions of Ecuador as a Source of Health-Promoting Compounds. *Plant Foods for Human Nutrition* 2019 74:3 **2019**, 74, 350–357, doi:10.1007/S11130-019-00744-8.

21. Collantes Díaz, I.E.; Cóndor Cuyubamba, E.A. Contribución al Estudio Fitoquímico de Los Tubérculos de Ullucus Tuberosus Caldas. *Revista de la Sociedad Química del Perú* **2020**, *86*, 105–111.
22. Heil, N.; Bravo, K.; Montoya, A.; Robledo, S.; Osorio, E. Wound Healing Activity of Ullucus Tuberosus, an Andean Tuber Crop. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 538–543, doi:10.1016/J.APJTb.2017.05.007.
23. Kasper, J.C.; Friess, W. The Freezing Step in Lyophilization: Physico-Chemical Fundamentals, Freezing Methods and Consequences on Process Performance and Quality Attributes of Biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, *78*, 248–263, doi:10.1016/J.EJPB.2011.03.010.
24. Licon, C. Proximate and Other Chemical Analyses. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition* **2022**, *2*, 521–529, doi:10.1016/B978-0-12-818766-1.00344-5.
25. Lattanzio, V. Phenolic Compounds: Introduction. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* **2013**, 1543–1580, doi:10.1007/978-3-642-22144-6_57/FIGURES/00577.
26. Nardini, M. Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. *Molecules* **2022**, Vol. 27, **2022**, *27*, doi:10.3390/MOLECULES27030783.
27. Vuolo, M.M.; Lima, V.S.; Maróstica Junior, M.R. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* **2019**, 33–50, doi:10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5.
28. Escarpa, A.; Gonzalez, M.C. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 57–139, doi:10.1080/20014091076695.
29. Huang, Y.; Xu, B. Critical Review on the Intervention Effects of Flavonoids from Cereal Grains and Food Legumes on Lipid Metabolism. *Food Chem.* **2025**, *464*, 141790, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2024.141790.
30. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Los Polifenoles, Compuestos de Origen Natural Con Efectos Saludables Sobre El Sistema Cardiovascular. *Nutr. Hosp.* **2012**, *27*, 76–89, doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418.
31. Barnes, S. Soy Isoflavones—Phytoestrogens and What Else? *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1225S–1228S, doi:10.1093/JN/134.5.1225S.
32. Yu, J.; Bi, X.; Yu, B.; Chen, D. Isoflavones: Anti-Inflammatory Benefit and Possible Caveats. *Nutrients* **2016**, Vol. 8, **2016**, *8*, doi:10.3390/NU8060361.
33. Kim, I.; Vozniuk, V.; Volkov, D.; Klykov, A. Study of Anthocyanins in Tubers of Potato Hybrids (*Solanum Tuberosum* L.) of Primorsky Krai Selection. *Lecture Notes in Networks and Systems* **2022**, *353 LNNS*, 113–121, doi:10.1007/978-3-030-91402-8_14/SAVE-RESEARCH.

34. Tosi, N.; Bresciani, L.; Favari, C.; Rosi, A.; Dodi, R.; Bertelé, A.; Curti, C.; Crozier, A.; Del Rio, D.; Brighenti, F.; et al. How Does the Flavan-3-Ol Structure Condition the Qualitative Quantitative Production of Phenolic Metabolites? Insights from a 3-Arm Intervention. *Food Chem.* **2025**, *491*, 145207, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2025.145207.
35. Georgieva, P.; Ivanov, Y.; Chengolova, Z.; Nakov, G.; Godjevargova, T. Stability of Individual Phenolic Compounds and Antioxidant Activity During Storage of a Syrah Grape Seed Extract. *Processes* **2026**, Vol. 14, **2026**, *14*, doi:10.3390/PR14111721.
36. Harborne, J.B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*; Springer Netherlands, 1984;
37. Weiß, K.; Alt, M. Determination of Single Sugars, Including Inulin, in Plants and Feed Materials by High-Performance Liquid Chromatography and Refraction Index Detection. *Fermentation* **2017**, Vol. 3, **2017**, *3*, doi:10.3390/FERMENTATION3030036.
38. Petrucci, E.; Boscutti, F.; Vianello, A.; Casolo, V. 'Last In-First Out': Seasonal Variations of Non-Structural Carbohydrates, Glucose-6-Phosphate and ATP in Tubers of Two Arum Species. *Plant Biol.* **2018**, *20*, 346–356, doi:10.1111/PLB.12673;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:14388677;WGROU:STRING: PUBLICATION.
39. Hartmann, H.; Trumbore, S. Understanding the Roles of Nonstructural Carbohydrates in Forest Trees - from What We Can Measure to What We Want to Know. *New Phytol.* **2016**, *211*, 386–403, doi:10.1111/NPH.13955;WGROU:STRING: PUBLICATION.
40. Morales-Fernández, S.D.; Mora-Aguilar, R.; Salinas-Moreno, Y.; Rodríguez-Pérez, J.E.; Colinas-León, M.T.; Lozoya-Saldaña, H.; Morales-Fernández, S.D.; Mora-Aguilar, R.; Salinas-Moreno, Y.; Rodríguez-Pérez, J.E.; et al. Growth and Sugar Content of Potato Tubers in Four Maturity Stages under Greenhouse Conditions. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **2018**, *24*, 53–67, doi:10.5154/R.RCHSH.2016.11.029.
41. Egharevba, H.O.; Egharevba, H.O. *Chemical Properties of Starch and Its Application in the Food Industry*; IntechOpen, 2020; ISBN 978-1-83880-116-8.
42. Madrigal, L.; Sangronis, E. La Inulina y Derivados Como Ingredientes Claves En Alimentos Funcionales. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2007**, *57*.
43. Shen, L.; Pang, S.; Zhong, M.; Sun, Y.; Qayum, A.; Liu, Y.; Rashid, A.; Xu, B.; Liang, Q.; Ma, H.; et al. A Comprehensive Review of Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) for Bioactive Components: Principles, Advantages, Equipment, and Combined Technologies. *Ultrason. Sonochem.* **2023**, *101*, 106646, doi:10.1016/J.ULTSONCH.2023.106646.
44. Angela A. Meireles, M.; Braga, M.; Leal, P.; Mar√≥stica, M.; Pereira, C.; Takeuchi, T. Low-Pressure Solvent Extraction (Solid-Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. In *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*; 2008; Vol. 1st Edition, pp. 137–218.

45. Badawy, M.E.I.; El-Nouby, M.A.M.; Kimani, P.K.; Lim, L.W.; Rabea, E.I. A Review of the Modern Principles and Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Chromatographic Analysis. *Analytical Sciences* **2022**, *38*, 1457, doi:10.1007/S44211-022-00190-8.
46. Kaur, G.; Singh, H.; Singh, J. UV-Vis Spectrophotometry for Environmental and Industrial Analysis. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Analytical Techniques for Environmental and Industrial Analysis* **2021**, 49–68, doi:10.1016/B978-0-12-821883-9.00004-7.
47. Pérez, M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R.M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)Phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 17543–17553, doi:10.1021/ACS.JAFC.3C04022.
48. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158, doi:10.5344/AJEV.1965.16.3.144.
49. Rumpf, J.; Burger, R.; Schulze, M. Statistical Evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin–Ciocalteu Assays to Assess the Antioxidant Capacity of Lignins. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *233*, 123470, doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123470.
50. Xiao, F.; Xu, T.; Lu, B.; Liu, R. Guidelines for Antioxidant Assays for Food Components. *Food Front.* **2020**, *1*, 60–69, doi:10.1002/FFT2.10;CTYPE:STRING;JOURNAL.
51. Muñoz-Bernal, Ó.A.; Torres-Aguirre, G.A.; Núñez-Gastélum, J.A.; Rosa, L.A. de la; Rodrigo-García, J.; Ayala-Zavala, J.F.; Álvarez-Parrilla, E.; Muñoz-Bernal, Ó.A.; Torres-Aguirre, G.A.; Núñez-Gastélum, J.A.; et al. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo de Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación de Polifenoles Totales. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* **2017**, *20*, 23–28, doi:10.1016/J.RECQB.2017.04.003.
52. Christodoulou, M.C.; Orellana Palacios, J.C.; Hesami, G.; Jafarzadeh, S.; Lorenzo, J.M.; Domínguez, R.; Moreno, A.; Hadidi, M. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants* **2022**, Vol. 11, **2022**, *11*, doi:10.3390/ANTIOX11112213.
53. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, Vol. 22, **2021**, *22*, doi:10.3390/IJMS22073380.
54. Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature* **1951**, *168*, 167, doi:10.1038/168167A0.
55. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **2002**, *31*, 426–428, doi:10.1021/AC60147A030.

56. Robbins, R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887, doi:10.1021/JF026182T.
57. Corradini, E.; Foglia, P.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Laganà, A. Flavonoids: Chemical Properties and Analytical Methodologies of Identification and Quantitation in Foods and Plants. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 469–495, doi:10.1080/14786419.2010.482054.
58. Kuppan, C.; Lakka, N.S.; Vadagam, N. Role of Evaporative Light Scattering Detectors in HPLC and UPLC—a Comprehensive Review of Operating Principle and Method Development Principles. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2026**, doi:10.1080/10826076.2025.2602140.
59. Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaporative Light Scattering Detection: Trends in Its Analytical Uses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007 388:8 **2007**, *388*, 1663–1672, doi:10.1007/S00216-007-1344-6.
60. Nagy, K.; Vékey, K. Separation Methods. In *Medical Applications of Mass Spectrometry*; Elsevier, 2008; pp. 61–92 ISBN 9780444519801.
61. Benkeblia, N. Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Metabolomics Platforms: Tools for Plant Oligosaccharides Analysis. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2023**, *5*, 100304, doi:10.1016/J.CARPTA.2023.100304.
62. Al-Mhanna, N.M.; Huebner, H.; Buchholz, R. Analysis of the Sugar Content in Food Products by Using Gas Chromatography Mass Spectrometry and Enzymatic Methods. *Foods* 2018, Vol. 7, **2018**, *7*, doi:10.3390/FOODS7110185.
63. Ruiz-Matute, A.I.; Hernández-Hernández, O.; Rodríguez-Sánchez, S.; Sanz, M.L.; Martínez-Castro, I. Derivatization of Carbohydrates for GC and GC–MS Analyses. *Journal of Chromatography B* **2011**, *879*, 1226–1240, doi:10.1016/J.JCHROMB.2010.11.013.
64. Marza, F.; Geunhee, P.; Sohyeon, J.; Lee, S.-G. Mineral Composition in the Diversity of Tuber Species from Bolivia. *Journal of the Korean Society of International Agriculture* **2024**, *36*, 28–38, doi:10.12719/KSIA.2024.36.1.28.
65. Garcia Huaranca, E. Evaluación Bromatológica Del Olluco Silvestre (*Ullucus Tuberosus* Subsp. *Aborigineus*) Procedente Del Distrito de Ticrapo Para Su Uso Agroindustrial, 2021.
66. Pari-Castro, M.; Arteaga-Llacza, P.; Miranda-Jara, A.; Quispe-Barrantes, P.; Miranda-Chávez, H.; Quispe-Solano, M.Á.; Chuquilín-Goicochea, R. Chemical Composition, Color y Moisture of Slices Dried by Refractance Window of Two *Ullucus Tuberosus* Morphotypes. *Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology* **2021**, doi:10.18687/LEIRD2021.1.1.47.
67. Marquez Mendoza, H.C. Composición Nutricional y de Mucílago de Tres Variedades de Olluco (*Ullucus Tuberosus* Loz.) Para La Obtención de Chuño de Olluco En El Distrito de Santo Tomás - Cusco, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco: Cusco, Perú, 2019.

68. Valcárcel-Yamani, B.; Rondán-Sanabria, G.G.; Finardi-Filho, F. The Physical, Chemical and Functional Characterization of Starches from Andean Tubers: Oca (*Oxalis Tuberosa* Molina), Olluco (*Ullucus Tuberosus* Caldas) and Mashua (*Tropaeolum Tuberosum* Ruiz & Pavón). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *49*, 453–464, doi:10.1590/S1984-82502013000300007.
69. Leterme, P.; Buldgen, A.; Estrada, F.; Londoño, A.M. Mineral Content of Tropical Fruits and Unconventional Foods of the Andes and the Rain Forest of Colombia. *Food Chem.* **2006**, *95*, 644–652, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2005.02.003.
70. Zavaleta, P.; María, A. Capacidad Antioxidante y Principales Ácidos Fenólicos Y de Algunos Alimentos. *Horiz. Med. (Barcelona)*. **2005**, *5*.
71. Sánchez Paredes, D.A.; Pérez Salinas, R.N. Determinación Del Perfil Lipídico En Harinas de Chocho (*Lupinus Mutabilis* Sweet) y Melloco Blanco (*Ullucus Tuberosus*) Para Establecer El Contenido de Ácidos Grasos Saturados e Insaturados, Universidad Técnica de Ambato (UTA). Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Biotecnología: Ambato- Ecuador, 2023.
72. Suárez Calle, J. Determinación de Componentes Fenólicos y Antioxidantes En La Harina de Chocho (*Lupinus Mutabilis* Sweet) y Melloco Blanco (*Ullucus Tuberosus*), Universidad Técnica de Ambato: Amabato-Ecuador, 2023.
73. Chuquilín Goicochea, R.C. Determinación de Compuestos Bioactivos de Cjaya y Chullcce Obtenidos de *Oxalis Tuberosa* Molina y *Ullucus Tuberosus* Caldas y Su Contribución a La Actividad Antioxidante, Universidad Nacional de Huancavelica: Huancavelica-Perú, 2021.
74. Horwitz, W.; Latimer, G.W. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; 18th ed.; AOAC INTERNATIONAL: Maryland-USA, 2005; ISBN 0-935584-77-3.
75. Paul, B.N.; Chanda, S.; Das, S.; Singh, P.; Pandey, B.K.; Giri, S.S. Mineral Assay in Atomic Absorption Spectroscopy. *The Beats of Natural Sciences* **2014**, *1*, 1–17.
76. Ahmed, T.; Rana, M.R.; Maisha, M.R.; Sayem, A.S.M.; Rahman, M.; Ara, R. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Content & Antioxidant Activity of Hog Plum (*Spondias Pinnata* L. f. Kurz) Pulp by Response Surface Methodology. *Heliyon* **2022**, *8*, e11109, doi:10.1016/J.HELİYON.2022.E11109.
77. Das, P.; Nayak, P.K.; Kesavan, R. krishnan Ultrasound Assisted Extraction of Food Colorants: Principle, Mechanism, Extraction Technique and Applications: A Review on Recent Progress. *Food Chemistry Advances* **2022**, *1*, 100144, doi:10.1016/J.FOCHA.2022.100144.
78. Sayem, A.S.M.; Ahmed, T.; Mithun, M.U.K.; Rashid, M.; Rana, M.R. Optimising Ultrasound-Assisted Extraction Conditions for Maximising Phenolic, Flavonoid Content and Antioxidant Activity in Hog Plum Peel and Seed: A Response Surface Methodology Approach. *J. Agric. Food Res.* **2024**, *18*, 101312, doi:10.1016/J.JAFR.2024.101312.

79. Xia, J.X.; Zhao, B. Bin; Zan, J.F.; Wang, P.; Chen, L.L. Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Artemisiae Argyi Folium* by HPLC-MS/MS and Discovery of Antioxidant Ingredients Based on Relevance Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *175*, 112734, doi:10.1016/J.JPBA.2019.06.031.
80. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 669–675, doi:10.1016/J.JFCA.2006.01.003.
81. Borman, P.; Elder, D. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures. In *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*; Wiley, 2017; pp. 127–166 ISBN 9781118971147.
82. Pereira, O.R.; Peres, A.M.; Silva, A.M.S.; Domingues, M.R.M.; Cardoso, S.M. Simultaneous Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in *Thymus x Citriodorus* Using a Validated HPLC–UV and ESI–MS Combined Method. *Food Research International* **2013**, *54*, 1773–1780, doi:10.1016/J.FOODRES.2013.09.016.
83. Choi, N.R.; Yoon, Y.J.; Park, K.T.; Kim, K.A.; Kim, Y.P.; Ahn, Y.G.; Lee, J.Y. Trace Level Determination of Saccharides in Pristine Marine Aerosols by Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. *Toxics* **2021**, Vol. 9, **2021**, 9, doi:10.3390/TOXICS9040086.
84. Naumann, M.; Koch, M.; Thiel, H.; Gransee, A.; Pawelzik, E. The Importance of Nutrient Management for Potato Production Part II: Plant Nutrition and Tuber Quality. *Potato Research* **2019**, *63*, 121–137, doi:10.1007/S11540-019-09430-3.
85. Dramićanin, A.; Andrić, F.; Mutić, J.; Stanković, V.; Momirović, N.; Milojković-Opšćenica, D. Content and Distribution of Major and Trace Elements as a Tool to Assess the Genotypes, Harvesting Time, and Cultivation Systems of Potato. *Food Chem.* **2021**, *354*, 129507, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.129507.
86. Putra, V.G.P.; Mutiarahma, S.; Chaniago, W.; Rahmadi, P.; Kurnianto, D.; Hidayat, C.; Carrera, C.; Palma, M.; Setyaningsih, W.; Putra, V.G.P.; et al. An Ultrasound-Based Technique for the Analytical Extraction of Phenolic Compounds in Red Algae. *Arabian Journal of Chemistry* **2022**, *15*, 103597, doi:10.1016/J.ARABJC.2021.103597.
87. Sulejmanović, M.; Milić, N.; Mourtzinis, I.; Nastić, N.; Kyriakoudi, A.; Drljača, J.; Vidović, S. Ultrasound-Assisted and Subcritical Water Extraction Techniques for Maximal Recovery of Phenolic Compounds from Raw Ginger Herbal Dust toward in Vitro Biological Activity Investigation. *Food Chem.* **2024**, *437*, 137774, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2023.137774.
88. Riciputi, Y.; Diaz-de-Cerio, E.; Akyol, H.; Capanoglu, E.; Cerretani, L.; Caboni, M.F.; Verardo, V. Establishment of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Industrial Potato by-Products Using Response Surface Methodology. *Food Chem.* **2018**, *269*, 258–263, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.154.

89. Phuong, N.N.M.; Le, T.T.; Dang, M.Q.; Van Camp, J.; Raes, K. Selection of Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.) Peel. *Food and Bioprocess Processing* **2020**, *122*, 222–229, doi:10.1016/J.FBP.2020.05.008.
90. Raposo, F.; Borja, R.; Gutiérrez-González, J.A. A Comprehensive and Critical Review of the Unstandardized Folin-Ciocalteu Assay to Determine the Total Content of Polyphenols: The Conundrum of the Experimental Factors and Method Validation. *Talanta* **2024**, *272*, 125771, doi:10.1016/J.TALANTA.2024.125771.
91. Sasikala S; Radhaisri S Analysis of Total Phenol in Developed Nutraceutical by UV-VIS Spectrophotometry. *International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN* **2015**, *6*.
92. Kumar, K.; Srivastav, S.; Sharanagat, V.S. Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing by-Products: A Review. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *70*, 105325, doi:10.1016/J.ULTSONCH.2020.105325.
93. Ojeda, G.A.; Sgroppo, S.C.; Sánchez Moreno, C.; de Ancos Sigüero, B. Mango ‘Criollo’ by-Products as a Source of Polyphenols with Antioxidant Capacity. Ultrasound Assisted Extraction Evaluated by Response Surface Methodology and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS Characterization. *Food Chem.* **2022**, *396*, 133738, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2022.133738.
94. Loukri, A.; Kissas, T.; Kyriakoudi, A.; Zymvrakaki, E.; Stratakis, A.C.; Mourtzinou, I. Coupling of Cold Atmospheric Plasma Treatment with Ultrasound-Assisted Extraction for Enhanced Recovery of Bioactive Compounds from Cornelian Cherry Pomace. *Food Chem.* **2024**, *455*, 139989, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2024.139989.
95. He, B.; Zhang, L.L.; Yue, X.Y.; Liang, J.; Jiang, J.; Gao, X.L.; Yue, P.X. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Blueberry (*Vaccinium Ashei*) Wine Pomace. *Food Chem.* **2016**, *204*, 70–76, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.094.
96. Martins, G.R.; Monteiro, A.F.; do Amaral, F.R.L.; da Silva, A.S. A Validated Folin-Ciocalteu Method for Total Phenolics Quantification of Condensed Tannin-Rich Açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.) Seeds Extract. *Journal of Food Science and Technology* **2021**, *58*, 4693–4702, doi:10.1007/S13197-020-04959-5.
97. KHOMDRAM, S.D.; SINGH, P.K. Polyphenolic Compounds and Free Radical Scavenging Activity in Eight Lamiaceae Herbs of Manipur. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj. Napoca.* **2011**, *3*, 108–113, doi:10.15835/NSB325638.
98. Attard, E. A Rapid Microtitre Plate Folin-Ciocalteu Method for the Assessment of Polyphenols. *Central European Journal of Biology* **2012**, *8*, 48–53, doi:10.2478/S11535-012-0107-3.
99. Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666, doi:10.1021/JF803537K.
100. Sethi, S.; Joshi, A.; Arora, B.; Bhowmik, A.; Sharma, R.R.; Kumar, P. Significance of FRAP, DPPH, and CUPRAC Assays for Antioxidant Activity Determination in Apple Fruit

- Extracts. *European Food Research and Technology* 2020 246:3 **2020**, 246, 591–598, doi:10.1007/S00217-020-03432-Z.
101. Kupina, S.; Fields, C.; Roman, M.C.; Brunelle, S.L. Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. *J. AOAC Int.* **2018**, 101, 1466–1472, doi:10.5740/JAOACINT.18-0031.
 102. Musci, M.; Yao, S. Optimization and Validation of Folin–Ciocalteu Method for the Determination of Total Polyphenol Content of Pu-Erh Tea. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2017**, 68, 913–918, doi:10.1080/09637486.2017.1311844.
 103. Ma, Q.-Y.; Xu, Q.-D.; Chen, N.; Zeng, W.-C. Effects of Protein Characteristics on Three Methods for Determination of Total Phenolic Content in Food Systems. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2025 20:3 **2025**, 20, 3000–3012, doi:10.1007/S11694-025-03891-6.
 104. Muñoz-Bernal, Ó.A.; Torres-Aguirre, G.A.; Núñez-Gastélum, J.A.; de la Rosa, L.A.; Rodrigo-García, J.; Ayala-Zavala, J.F.; Álvarez-Parrilla, E. NUEVO ACERCAMIENTO A LA INTERACCIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU CON AZÚCARES DURANTE LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES. *TIP* **2017**, 20, 23–28, doi:10.1016/J.RECQB.2017.04.003.
 105. Muñoz, A.M.; Jimenez-Champi, D.; Contreras-López, E.; Fernández-Jerí; Aguilar, L.; Ramos-Escudero Valorization of Extracts of Andean Roots and Tubers and Its Byproducts: Bioactive Components and Antioxidant Activity in Vitro. *Journal Research* **2023**, 7, 55–63, doi:10.26656/fr.2017.7(4).002.
 106. Zhao, H.Y.; Sun, J.H.; Fan, M.X.; Fan, L.; Zhou, L.; Li, Z.; Han, J.; Wang, B.R.; Guo, D.A. Analysis of Phenolic Compounds in Epimedium Plants Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1190, 157–181, doi:10.1016/J.CHROMA.2008.02.109.
 107. Wu, C.; Ma, B.; McClements, D.J.; Lai, Z.; Hou, J.; Wang, S.; Wang, X.; Qiu, Y.; Wu, F.; Fang, G.; et al. Fractionation of Phenolic Compounds from Hickory By-Products Using Solid Phase Extraction-Sonication: Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Food Chem.* **2024**, 460, 140633, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2024.140633.
 108. Palafox-Carlos, H.; Yahia, E.M.; González-Aguilar, G.A. Identification and Quantification of Major Phenolic Compounds from Mango (*Mangifera Indica*, Cv. Ataulfo) Fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and Their Individual Contribution to the Antioxidant Activity during Ripening. *Food Chem.* **2012**, 135, 105–111, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2012.04.103.
 109. Truong, V.D.; McFeeters, R.F.; Thompson, R.T.; Dean, L.L.; Shofran, B. Phenolic Acid Content and Composition in Leaves and Roots of Common Commercial Sweetpotato (*Ipomea Batatas* L.) Cultivars in the United States. *J. Food Sci.* **2007**, 72, C343–C349, doi:10.1111/J.1750-3841.2007.00415.X;ISSUE:ISSUE:DOI.
 110. Santos, S.A.O.; Vilela, C.; Freire, C.S.R.; Neto, C.P.; Silvestre, A.J.D. Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Applied to the

- Identification of Valuable Phenolic Compounds from Eucalyptus Wood. *Journal of Chromatography B* **2013**, 938, 65–74, doi:10.1016/J.JCHROMB.2013.08.034.
111. Wang, Y.; Liu, Y.; Xiao, C.; Liu, L.; Hao, M.; Wang, J.; Liu, X. Simultaneous Determination of 15 Phenolic Constituents of Chinese Black Rice Wine by HPLC-MS/MS with SPE. *J. Food Sci.* **2014**, 79, C1100–C1105, doi:10.1111/1750-3841.12483;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:17503841;WGROU:STRING:PUBLICATION.
 112. Luo, L.; Cui, Y.; Zhang, S.; Li, L.; Suo, H.; Sun, B. Detailed Phenolic Composition of Vidal Grape Pomace by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2017**, 1068–1069, 201–209, doi:10.1016/J.JCHROMB.2017.10.031.
 113. Nzekoue, F.K.; Angeloni, S.; Navarini, L.; Angeloni, C.; Freschi, M.; Hrelia, S.; Vitali, L.A.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. Coffee Silverskin Extracts: Quantification of 30 Bioactive Compounds by a New HPLC-MS/MS Method and Evaluation of Their Antioxidant and Antibacterial Activities. *Food Research International* **2020**, 133, 109128, doi:10.1016/J.FOODRES.2020.109128.
 114. Cortese, M.; Gigliobianco, M.R.; Peregrina, D.V.; Sagratini, G.; Censi, R.; Di Martino, P. Quantification of Phenolic Compounds in Different Types of Crafts Beers, Worts, Starting and Spent Ingredients by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**, 1612, 460622, doi:10.1016/J.CHROMA.2019.460622.
 115. Irakli, M.; Skendi, A.; Bouloumpasi, E.; Chatzopoulou, P.; Biliaderis, C.G. LC-MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Solid Residues from the Essential Oil Industry. *Antioxidants* **2021**, Vol. 10, **2021**, 10, doi:10.3390/ANTIOX10122016.
 116. Castañeta, G.; Miranda-Flores, D.; Bascopé, M.; Peñarrieta, J.M. Characterization of Carotenoids, Proximal Analysis, Phenolic Compounds, Anthocyanidins and Antioxidant Capacity of an Underutilized Tuber (*Tropaeolum Tuberosum*) from Bolivia. *Discover Food* **2024**, 4, 9-, doi:10.1007/S44187-024-00078-8.
 117. Cömert, E.D.; Mogol, B.A.; Gökmen, V. Relationship between Color and Antioxidant Capacity of Fruits and Vegetables. *Curr. Res. Food Sci.* **2020**, 2, 1–10, doi:10.1016/J.CRFS.2019.11.001.
 118. Silva, L.B.A.R.; Pinheiro-Castro, N.; Novaes, G.M.; Pascoal, G. de F.L.; Ong, T.P. Bioactive Food Compounds, Epigenetics and Chronic Disease Prevention: Focus on Early-Life Interventions with Polyphenols. *Food Research International* **2019**, 125, 108646, doi:10.1016/J.FOODRES.2019.108646.
 119. Magnani, C.; Isaac, V.L.B.; Correa, M.A.; Salgado, H.R.N. Caffeic Acid: A Review of Its Potential Use in Medications and Cosmetics. *Analytical Methods* **2014**, 6, 3203–3210, doi:10.1039/C3AY41807C.

120. Ullah, A.; Munir, S.; Badshah, S.L.; Khan, N.; Ghani, L.; Poulson, B.G.; Emwas, A.H.; Jaremko, M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules* **2020**, Vol. 25, **2020**, 25, doi:10.3390/MOLECULES25225243.
121. Vollmannová, A.; Bojňanská, T.; Musilová, J.; Lidiková, J.; Cifrová, M. Quercetin as One of the Most Abundant Represented Biological Valuable Plant Components with Remarkable Chemoprotective Effects - A Review. *Heliyon* **2024**, 10, doi:10.1016/J.HELIYON.2024.E33342.
122. Wood, I.P.; Elliston, A.; Ryden, P.; Bancroft, I.; Roberts, I.N.; Waldron, K.W. Rapid Quantification of Reducing Sugars in Biomass Hydrolysates: Improving the Speed and Precision of the Dinitrosalicylic Acid Assay. *Biomass Bioenergy* **2012**, 44, 117–121, doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2012.05.003.
123. Lam, H.H.; Nguyen, T.M.T.; Do, T.A.S.; Dinh, T.H.; Dang-Bao, T. Quantification of Total Sugars and Reducing Sugars of Dragon Fruit-Derived Sugar-Samples by UV-Vis Spectrophotometric Method. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, 947, 012041, doi:10.1088/1755-1315/947/1/012041.
124. Chen, W.; Gao, L.; Song, L.; Sommerfeld, M.; Hu, Q. An Improved Phenol-Sulfuric Acid Method for the Quantitative Measurement of Total Carbohydrates in Algal Biomass. *Algal Res.* **2023**, 70, 102986, doi:10.1016/J.ALGAL.2023.102986.
125. Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.I.; Lee, Y.C. Carbohydrate Analysis by a Phenol–Sulfuric Acid Method in Microplate Format. *Anal. Biochem.* **2005**, 339, 69–72, doi:10.1016/J.AB.2004.12.001.
126. Negrulescu, A.; Patrulea, V.; Mincea, M.M.; Ionascu, C.; Vlad-Oros, B.A.; Ostafe, V. Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 2176–2182, doi:10.1590/S0103-50532013005000003.
127. Rahman, M.D.; Richards, G.N. Interference by Flavonoids in the Phenol-Sulfuric Acid Analysis of Carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1987**, 170, 112–115, doi:10.1016/0008-6215(87)85009-7.
128. Teixeira, R.S.S.; Da Silva, A.S.A.; Ferreira-Leitão, V.S.; Da Silva Bon, E.P. Amino Acids Interference on the Quantification of Reducing Sugars by the 3,5-Dinitrosalicylic Acid Assay Mislead Carbohydrase Activity Measurements. *Carbohydr. Res.* **2012**, 363, 33–37, doi:10.1016/J.CARRES.2012.09.024.
129. Kayeye, T.N.; Penton, A.; Ashton, J.; Noyes, S.; Venkatesan, K.; Sunna, A.; Wang, Y.; Rodger, A. Impact of Extraction Methods on the Determination of Protein, Fat, and Carbohydrate Content in Long-Life Plant-Based Milk Alternatives. *Journal of Food Composition and Analysis* **2026**, 152, 109014, doi:10.1016/J.JFCA.2026.109014.
130. Silva, R.A.C. da; Lemos, T.L.G. de; Ferreira, D.A.; Monte, F.J.Q.; Silva, R.A.C. da; Lemos, T.L.G. de; Ferreira, D.A.; Monte, F.J.Q. Ximenia Americana: Chemical and Spectral Studies

- of Extracts of Seeds. Analysis of Trimethylsilyl Derivatives by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Am. J. Analyt. Chem.* **2016**, 7, 192–202, doi:10.4236/AJAC.2016.72016.
131. De Jongh, D.C.; Radford, T.; Hribar, J.D.; Hanessian, S.; Bieber, M.; Dawson, G.; Sweeley, C.C. Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 91, 1728–1740, doi:10.1021/JA01035A022.
 132. Koh, D. wan; Park, J. woong; Lim, J. hoon; Yea, M.J.; Bang, D. young A Rapid Method for Simultaneous Quantification of 13 Sugars and Sugar Alcohols in Food Products by UPLC-ELSD. *Food Chem.* **2018**, 240, 694–700, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.07.142.
 133. Lindqvist, D.N.; Pedersen, H.Æ.; Rasmussen, L.H. A Novel Technique for Determination of the Fructose, Glucose and Sucrose Distribution in Nectar from Orchids by HPLC-ELSD. *Journal of Chromatography B* **2018**, 1081–1082, 126–130, doi:10.1016/J.JCHROMB.2018.02.019.
 134. Soyseven, M.; Sezgin, B.; Arli, G. A Novel, Rapid and Robust HPLC-ELSD Method for Simultaneous Determination of Fructose, Glucose and Sucrose in Various Food Samples: Method Development and Validation. *Journal of Food Composition and Analysis* **2022**, 107, 104400, doi:10.1016/J.JFCA.2022.104400.

9. Anexos

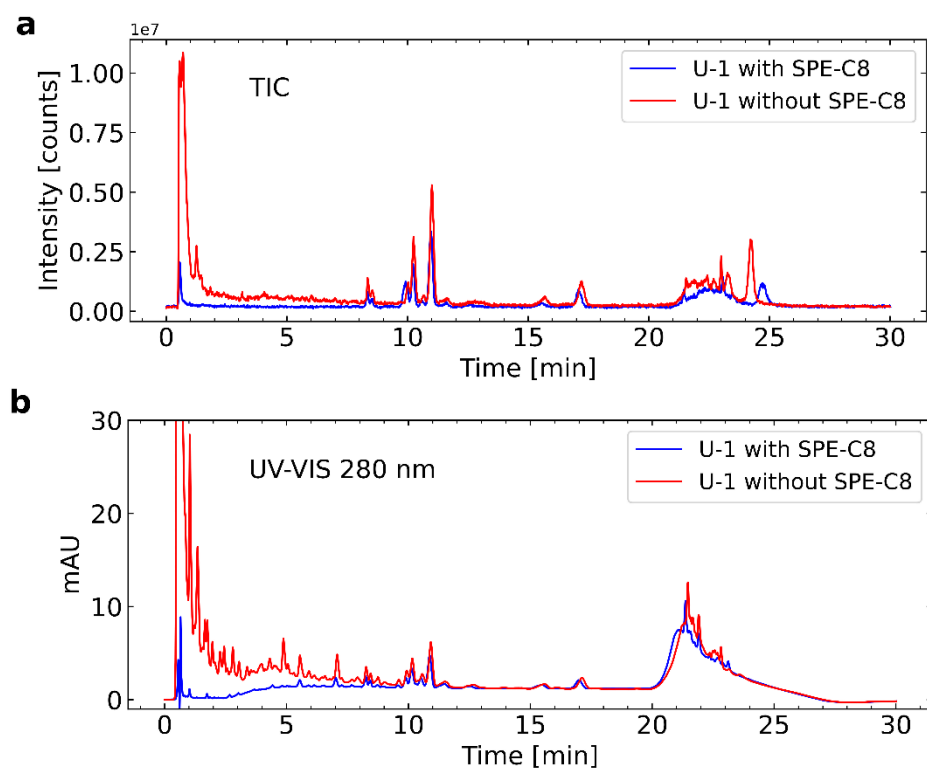


Figura 9.1 Cromatogramas de extractos de ulluco morado (U-1) por UHPL-ESI-MS/NS: a) Cromatograma de iones totales con y sin SPE-C8, b) Cromatogramas UV/Vis a 280 nm con y sin SPE-C8, b) Cromatogramas UV/Vis a 280 nm con y sin SPE-C8.

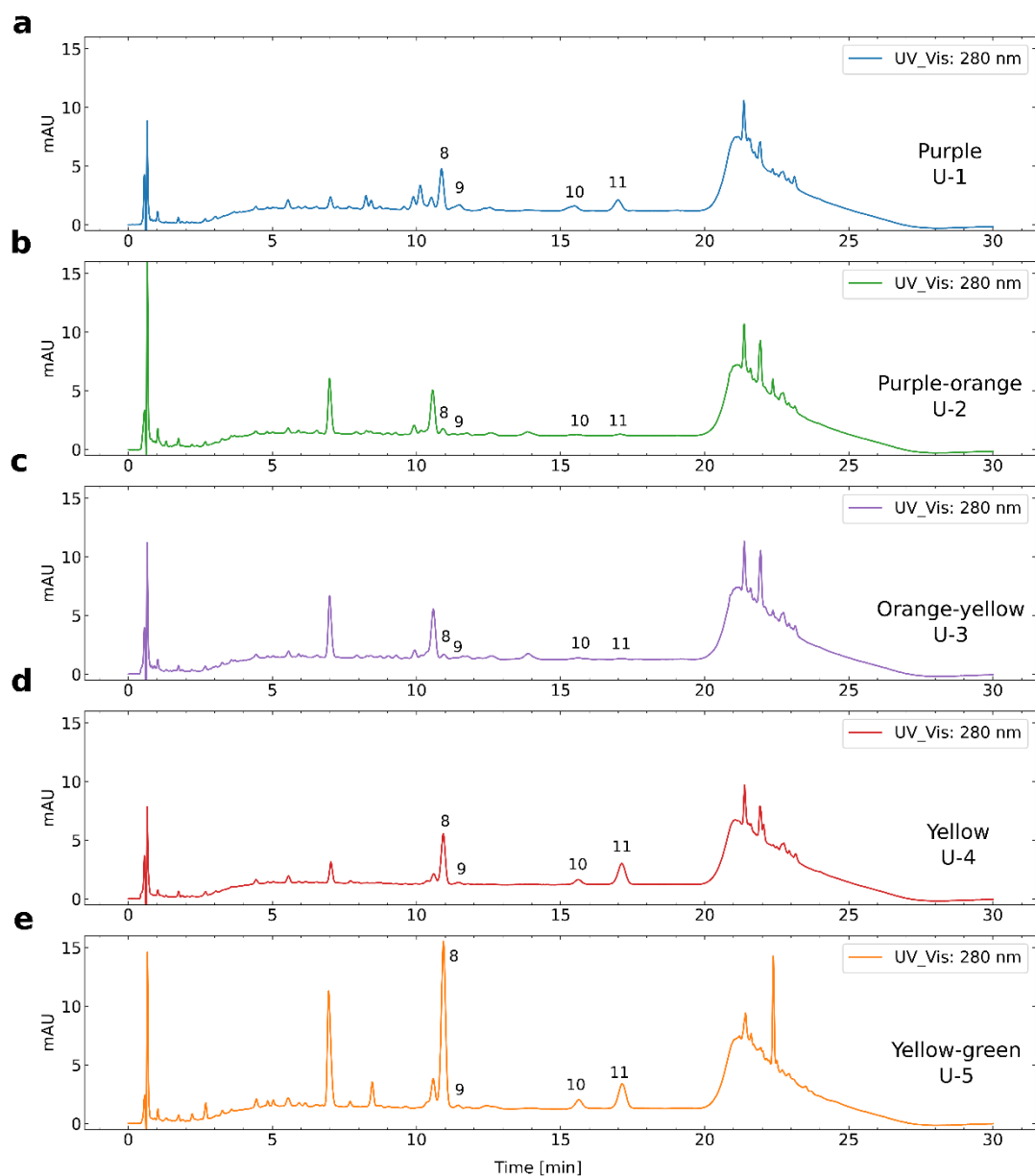


Figura 9.2 Cromatograma UV/Vis a 280 nm de cinco variedades de *Ullucus tuberosus* usando UHPLC-ESI-MS/MS: (a) Morado (U-1), (b) Morado-naranja (U-2), (c) Naranja-amarillo (U-3), (d) Amarillo (U-4), y (e) Amarillo-verde (U-5). Flavonoides: 8. Rutina, 9. Quercetina-3-glucósido, 10. Kaempferol-3-rutinósido, 11. Isorhamnetina-3-rutinósido.

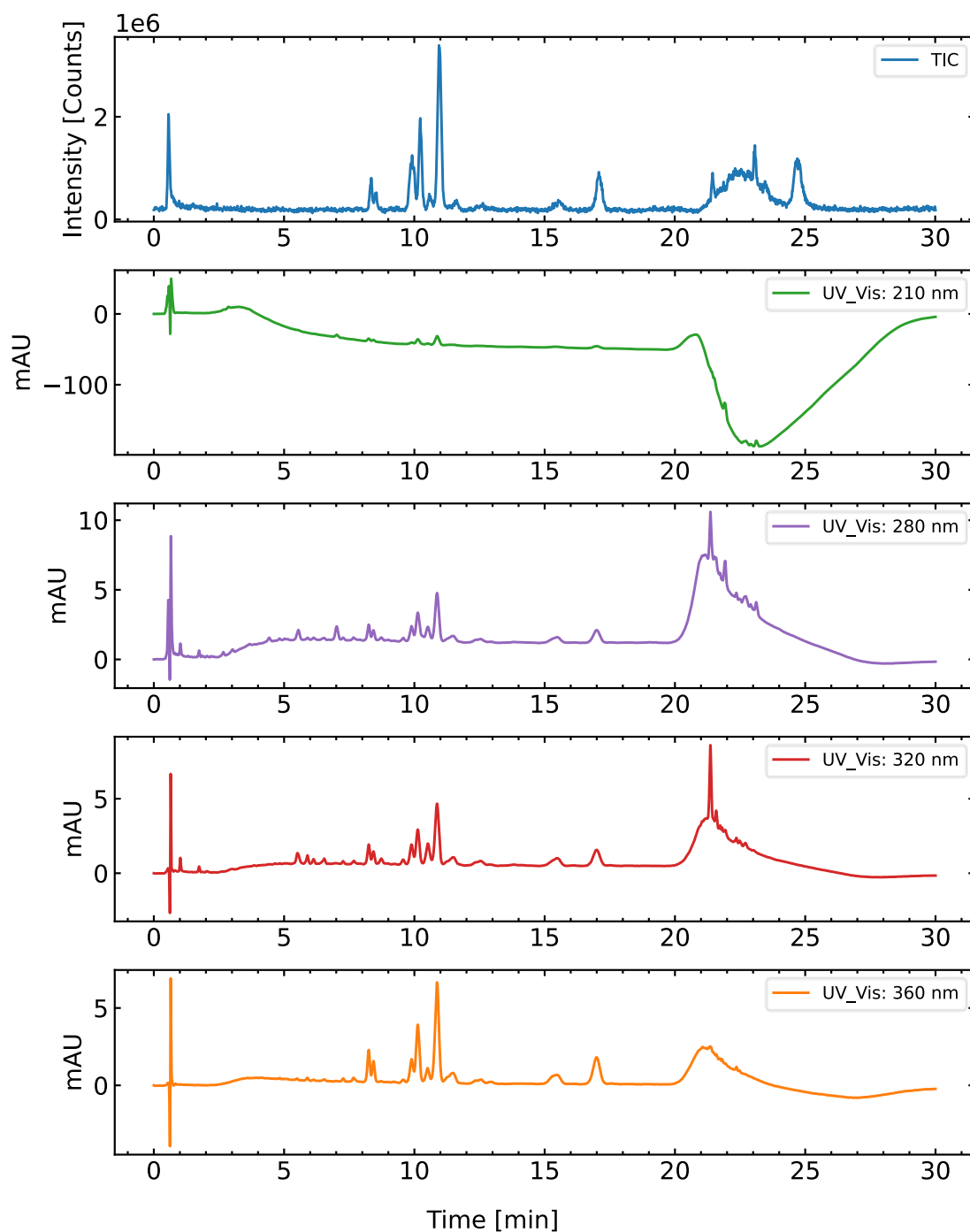


Figura 9.3 Cromatogramas del extracto de ulluco morado (U-1) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS

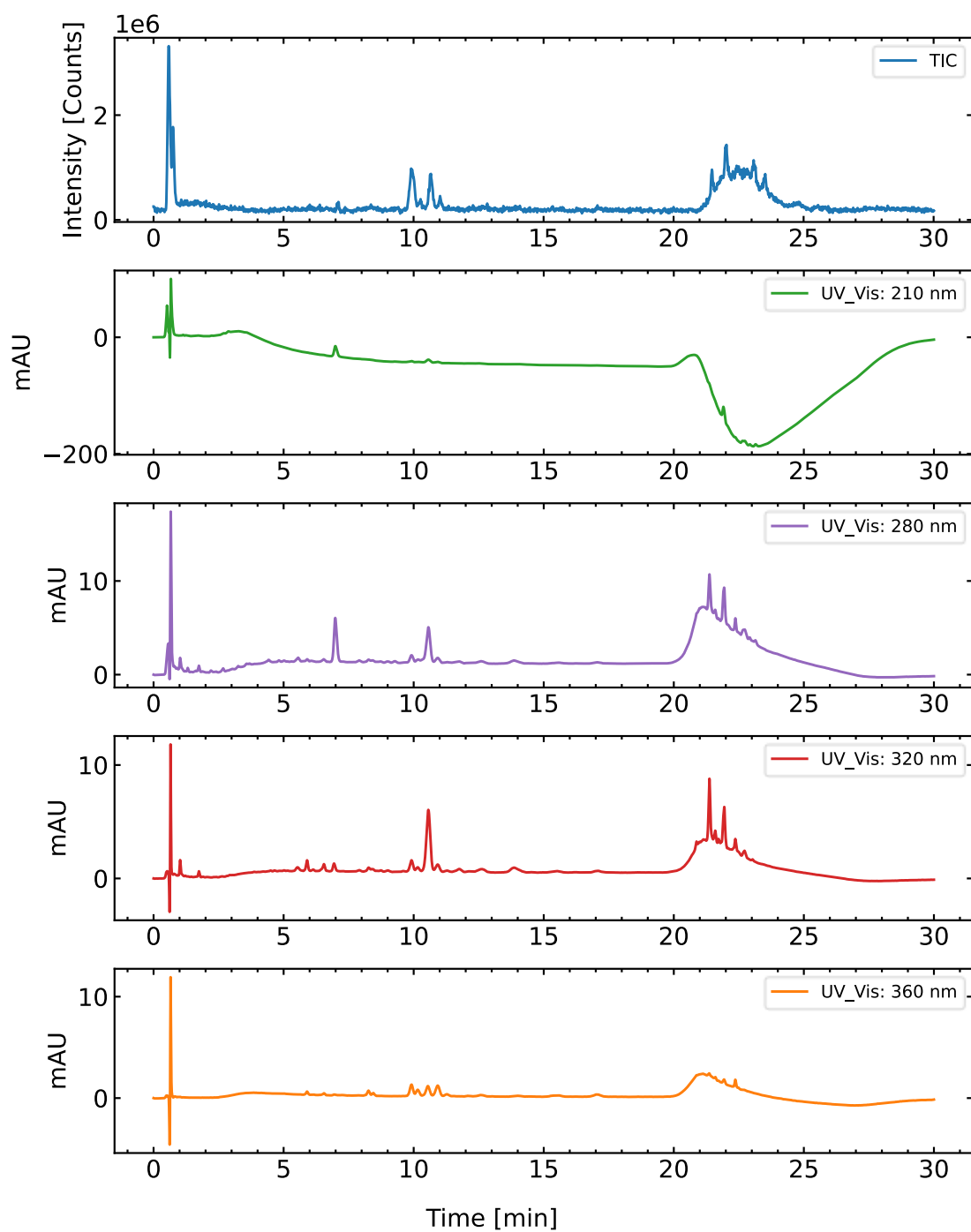


Figura 9.4 Cromatogramas del extracto de ulluco morado-naranja (U-2) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

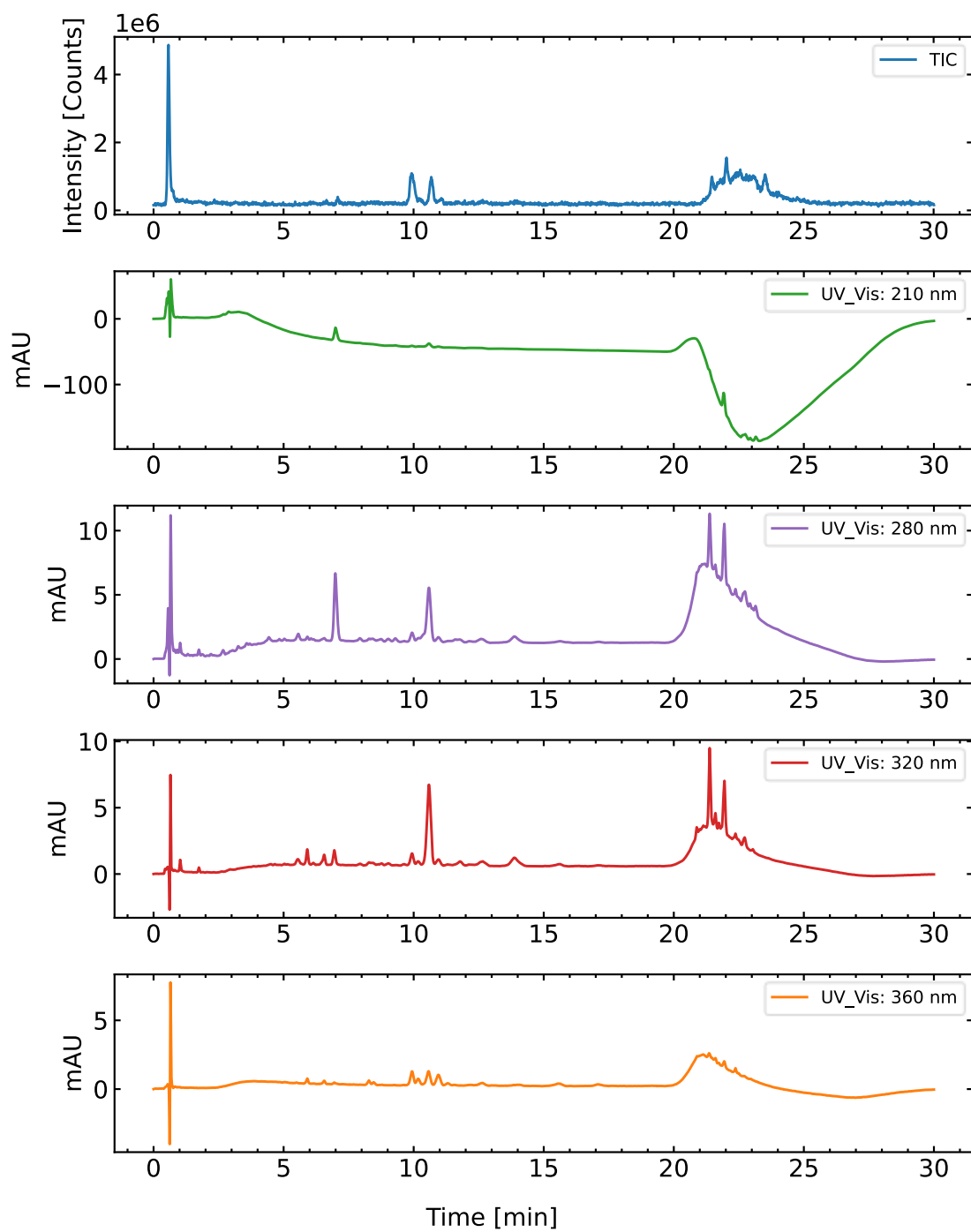


Figura 9.5 Cromatogramas del extracto de ulluco naranja-amarillo (U-3) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

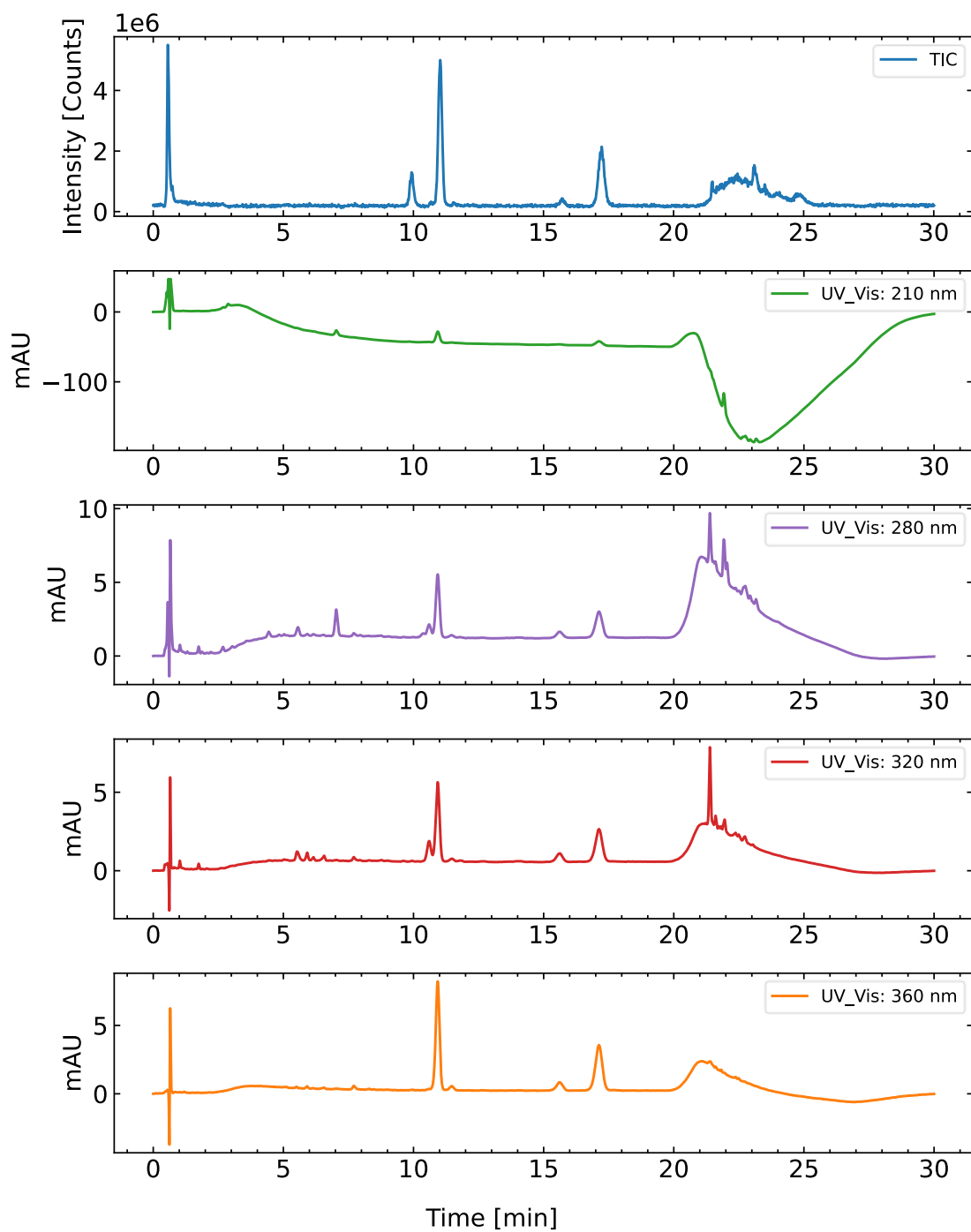


Figura 9.6 Cromatogramas del extracto de ulluco amarillo (U-4) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

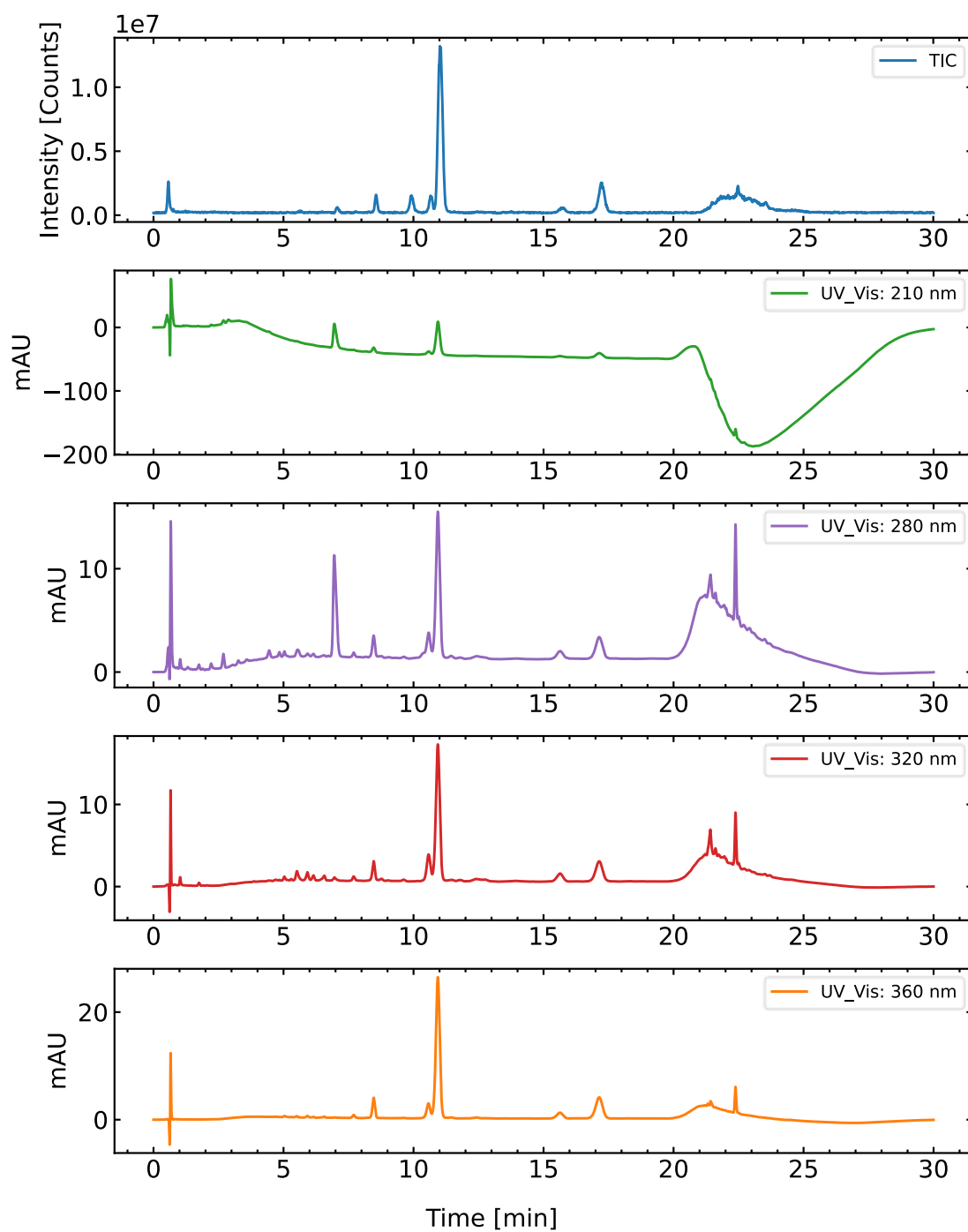


Figura 9.7 Cromatogramas del extracto de ulluco amarillo-verde (U-5) obtenidos mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

Tabla 9.1 Valores-*p* de la correlación estadística de Pearson

	CFT	FRAP	Rutina	Quercetina-3-glucósido	Kaempferol-3-rutinósido	Isorhamnetina-3-rutinósido
CFT	NA	0.006*	0.756	0.616	0.668	0.289
FRAP	0.006*	NA	0.572	0.563	0.490	0.175
Rutina	0.756	0.572	NA	0.966	0.015*	0.053
Quercetin-3-glucósido	0.616	0.563	0.966	NA	0.568	0.547
Kaempferol-3-rutinósido	0.668	0.490	0.015*	0.568	NA	0.022*
Isorhamnetina-3-rutinósido	0.289	0.175	0.053	0.547	0.022*	NA

(*): Significancia a $p < 0.05$

Tabla 9.2 Diseño de experimento Box-Behnken para la extracción de carbohidratos solubles totales usando extracción asistida con ultrasonido

Nº	Solvente (% v/v)	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Carbohidratos solubles totales (g EG/100 g DW)	
	A	B	C	Actual ± SD	Predictive
1	10	30	60	20.09 ± 0.96	19.83
2	0	60	60	21.81 ± 0.98	22.47
3	0	90	70	27.39 ± 0.44	27.04
4	20	90	70	20.84 ± 0.97	21.24
5	0	30	70	22.31 ± 0.82	21.91
6	20	30	70	21.61 ± 0.95	21.96
7	0	60	80	27.80 ± 0.70	27.89
8	10	90	60	19.65 ± 0.59	19.34
9	10	60	70	25.63 ± 0.61	25.19
10	10	60	70	25.41 ± 1.04	25.19
11	20	60	60	19.02 ± 0.66	18.93
12	10	60	70	25.12 ± 1.90	25.19
13	10	30	80	22.91 ± 0.95	23.22
14	20	60	80	26.35 ± 0.84	25.69
15	10	90	80	27.86 ± 1.32	28.12
16	10	60	70	24.47 ± 1.18	25.19
17	10	60	70	25.32 ± 1.08	25.19

n=3; SD = Standard deviation (desviación estándar)