

UNIVERSIDAD DISTRITAL

FRANCISCO JOSE DE CALDAS

PERFILADO METABÓLICO DE EJEMPLARES DEL GÉNERO *Lupinus* (FABACEAE) PRESENTES EN CUNDINAMARCA Y BOYACÁ.

Sandy Patricia Angarita Pabón

Laura Yuliet Castañeda González

Trabajo de grado

Director: Freddy Alexander Bernal

Codirector: Javier Matulevich Pelaez

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSE DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA

BOGOTA D.C

2016

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de grado antes que nada se lo dedicamos a Dios por bendecirnos y acompañarnos hasta este punto, logrando así cumplir con este sueño anhelado.

A nuestras familias por apoyarnos incondicionalmente, por sus consejos, valores y por la motivación constante que ha permitido que seamos personas de bien.

A la Universidad Distrital por ser nuestra alma mater, brindándonos la oportunidad de formarnos académicamente y abrirnos las puertas al conocimiento.

Al profesor Freddy Bernal por su esfuerzo, rectitud y dedicación en su profesión como docente; por sus consejos, que nos han formaron como personas e investigadoras.

A la Universidad Militar Nueva Granada, especialmente al profesor Ericsson Coy por recibirnos con los brazos abiertos en el Laboratorio de Bioorgánica, para la realización de nuestro proyecto.

Así mismo nos gustaría agradecerle a los docentes que tuvimos durante toda nuestra vida académica porque todos han aportaron en nuestra formación.

A todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto; muchas gracias por su apoyo y enseñanza.

C**ONTENIDO**

RESUMEN 6
ABSTRACT 7
CAPITULO 1: 12
Lupinus: Una visión general 12
1.1. INTRODUCCIÓN 12
1.2. ESTADO DEL ARTE 14
1.2.1. Distribución de la familia *Fabaceae* 14
1.2.2. Características morfológicas de la familia *Fabaceae* 15
1.2.3. Usos etnobotánicos de la familia *Fabaceae* 15
1.2.4. Fitoquímica y actividad biológica de la familia *Fabaceae* 16
1.2.5. Taxonomía del género *Lupinus* 16
1.2.6. Distribución de las especies del género *Lupinus* en Colombia 17
1.2.7. Características morfológicas del género *Lupinus* 17
1.2.8. Usos etnobotánicos del género *Lupinus* 18
1.2.9. Fitoquímica y actividad biológica del género *Lupinus* 19
1.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE 21
1.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN 21
1.5. QUIMIOMETRÍA 23
1.6. REFERENCIAS 26
CAPÍTULO 2: 32
Variabilidad química y capacidad captadora de radicales libres de especies de *Lupinus* 32
2.1. INTRODUCCIÓN 32
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 34
2.2.1. General 34
2.2.2. Selección del material vegetal 34
2.2.3. Recolección y clasificación del material vegetal. 34
2.2.4. Preparación de extractos 35
2.2.5. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT). 36
2.2.6. Determinación del contenido de flavonoides (FL). 36

2.2.7. Método de DPPH para la capacidad captadora de radicales libres (CCRL)...36
2.2.8. Análisis estadístico 37
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37
2.3.1. Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante....38
2.3.2. Correlación entre variables cuantitativas 51
2.4. CONCLUSIONES 54
2.5. REFERENCIAS 55
CAPÍTULO 3: 58
Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM). 58
3.1. INTRODUCCIÓN 58
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS....60
3.2.1. General....60
3.2.2. Perfilado por CLAE-DAD 60
3.2.3. Detección CLAE-DAD-EM....61
3.2.4. Análisis de espectros de masas....61
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 62
3.3.1. Análisis de los espectros de masas 62
3.3.2. Análisis del perfilado por CLAE-UV 69
3.4. CONCLUSIONES 82
3.5 REFERENCIAS 83
CAPÍTULO 4: 90
Relaciones metabólicas en especies pertenecientes al género *Lupinus* a partir del perfilado cromatográfico y datos cuantitativos. 90
4.1. INTRODUCCIÓN 90
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS....92
4.2.1. General....92
4.2.2. Tratamiento de datos 92
4.2.3. Análisis multivariado de datos cuantitativos 93
4.2.4. Análisis multivariado de la totalidad de perfiles cromatográficos. 93
4.2.5. Análisis multivariado con perfiles cromatográficos por cada órgano. 93

4.2.6. Análisis supervisado 93
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 94
4.3.1. Análisis de datos cuantitativos 94
4.3.2. Análisis multivariado de la totalidad de perfiles cromatográficos 101
4.3.3. Análisis multivariado con perfiles cromatográficos 103
4.3.4. Análisis supervisado 108
4.4. CONCLUSIONES 112
4.5. REFERENCIAS 113
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 117
ANEXOS 119
CAPÍTULO 2: Variabilidad química y capacidad captadora de radicales libres de especies de *Lupinus.* 119
CAPÍTULO 3: Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) 132
CAPÍTULO 4: Relaciones metabólicas en especies pertenecientes al género *Lupinus* a partir del perfilado cromatográfico y datos cuantitativos. 147

RESUMEN

Colombia cuenta con una riqueza vegetal inestimable, tanto así que se han pasado por alto los valiosos aportes que las plantas le pueden otorgar al desarrollo económico, social e investigativo del país. Por ello, se realizó el estudio del género *Lupinus*, por tratarse de plantas ampliamente distribuidas en el territorio nacional, pero que no cuentan con información quimiotaxonómica así como filogenética para las especies que comprenden este género, siendo necesaria la generación del presente documento, donde se muestra el perfilado metabolómico realizado a ejemplares del género *Lupinus*, plantas perteneciente a la familia Fabaceae, partiendo de los extractos etanólicos de hojas, tallos, flores, vainas y semillas; para ello, inicialmente se determinó el perfil químico a través de cuantificación de fenoles (CFT), flavonoides (FL) y capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Así mismo, los extractos fueron analizados por CLAE-EM con el fin de identificar los metabolitos secundarios detectables en cada órgano de la planta. Del análisis cuantitativo no se evidenció una correlación significativa entre el contenido de fenoles y flavonoides con el reactivo DPPH en casi todos los órganos de estudio, salvo aquella que mostraron las semillas entre el CFT y su CCRL (ccP de 0,60). A partir del perfil obtenido por el espectro UV-vis, se lograron detectar 28 compuestos mayoritarios en total: 23 en hojas, 20 en tallos, 14 en flores, 17 en vainas y 21 en semillas; para posteriormente ser identificados partiendo de los espectros de masas correspondientes por CLAE-EM. La identificación tentativa permitió definir la presencia de 27 flavonoides y un alcaloide. Para finalizar se realizó ACP y ACJ validando con ellos diferencias y similitudes entre los perfiles químicos de las diversas muestras; adicionalmente se realizó un análisis más profundo a través de mínimos cuadrados parciales ortogonales acoplado a análisis discriminante por CFT, FL y CCRL. En conclusión el género *Lupinus* se puede catalogar como un género cuyo comportamiento metabólico es amplio, ya que especímenes de 5 especies mostraron cambios en la composición química y contenido de metabolitos secundarios dependiendo del lugar, condiciones de cada planta, su entorno y época del año, ya sea produciendo o no ciertos compuestos que le ayudan a subsistir.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, metabolómica, quimiometría, CLAE-EM, análisis multivariado.

ABSTRACT

Colombia has an inestimable wealth plant and have overlooked the valuable contributions that plants can provide the economic, social and research development. Therefore, the study of the genus Lupinus was made, because it is distributed in the country widely plants, but gender does not have chemotaxonomic information and phylogenetics, the generation of this document still needed, shows the metabolomic profiling made to copies of genus Lupinus, plants belonging to the family Fabaceae, starting from the ethanol extracts of leaves, stems, flowers, pods and seeds; for this, initially the chemical profile was determined by quantification of phenols (CFT), flavonoids (FL) and free radical scavenging capacity (CCRL). Also, the extracts by HPLC were analyzed in order to identify the detectable secondary metabolites in each plant organ. Quantitative analysis a significant correlation between the CFT and FL was not evidenced with reagent DPPH in almost all organs of study, except that which showed the seeds between the CFT and CCRL (ccP=0.60). With HPLC-MS were achieved to detect 28 compounds in total, 23 in leaves, 20 in stems, 14 in flowers, 17 in pods and 21 in seeds; the tentative identification allowed to find 27 flavonoids and an alkaloid. Finally was PCA with HCA validating differences and similarities along with discrimination through Orthogonal Partial Least Squares, supervised by the CFT, FL and CCRL. In conclusion in genus *Lupinus* can be cataloged as versatile , since 5 species showed changes in the chemical composition and content of secondary metabolites depending on the place, conditions of each plant, their environment and time of year, whether producing or not certain compounds that help you survive.

Key words: Secondary metabolites, metabolomics, HPLC-MS, chemometrics, multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. A) Foto *L. mirabilis* en Usme, Bogotá. B) Partes del lupino.....18
Figura 1.2. Estructura química de algunos compuestos representativos en *Lupinus.* A) Alcaloides: 1. Esparteína, 2. Lupanina, 3. Anagirina, 4. 5,6-dehidrolupanina y 5. 13-hidroxilupanina. B) Terpenoides: Luteona. C) Isoflavonas: 6. Genisteina, 7. 2'-hidroxigenisteína y 8. Wighteona.....20
Figura .2.1. Ubicación de las muestras colectadas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. 35
Figura 2.2. Variabilidad química en hojas de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. La línea punteada indica la media para cada caso.....39
Figura 2.3. Variabilidad química en tallos de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. 43
Figura 2.4. Variabilidad química en flores de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. 46
Figura 2.5. Variabilidad química en vainas de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. 47
Figura 2.6. Variabilidad química en semillas de cinco especies del género *Lupinus.* Media ± intervalo de confianza. A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. 49
Figura 2.7. Correlación de Pearson entre los datos de CFT, FL Y CCRL en cinco especies del género *Lupinus*. A) Hojas. B) Tallos. C) Flores. D) Vainas. E) Semillas. 53
Figura 3.1. Estructuras químicas de compuestos hallados en extractos de *Lupinus*.....65
Figura 3.2.Perfiles cromatográficos de las diferentes partes del ejemplar 2 (*L. bogotensis*). H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas. 70
Figura 3.4. Cromatogramas de CLAE de los extractos etanólicos de hojas de *Lupinus mirabilis.* 73
Figura 3.5. Cromatogramas de CLAE de los extractos etanólicos de tallos de *Lupinus mirabilis*. 75

Figura 3.6. Cromatogramas de CLAE de extractos etanólicos de flores de *Lupinus mirabilis.* ..76
Figura 3.1. Cromatogramas de CLAE de los extractos etanólicos de vainas de *Lupinus mirabilis*……78

Figura 3.8. Cromatogramas de CLAE de extractos etanólicos de semillas de *Lupinus mirabilis*. 79
Figura 4.1. Análisis de componentes principales (ACP) y Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con la caracterización química de los extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus.* A. Score scatter plot. B. Dendrograma. Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. 94
Figura 4.2. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4. 96
Figura 4.3. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4. 98
Figura 4.4. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4. 99
Figura 4.5. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4.....100
Figura 4.6. Mínimos cuadrados parciales ortogonales con análisis discriminante según el órgano de la planta. H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas. 102
Figura 4.7. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.....103
Figura 4.8. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.....104
Figura 4.9. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.....105
Figura 4.10. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.....106
Figura 4.11. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. 107
Figura 4.12. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales de extractos de *Lupinus*, supervisado por el contenido de fenoles (A) Score scatter plot y (B) S-line 109

Figura 4.13. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales OPLS de extractos de tallos de *Lupinus*, supervisado por el contenido de fenoles (A) Score scatter plot y (B) S-line.....110
Figura 4.14. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales de extractos de vainas de *Lupinus*, supervisado la capacidad captadora de radicales libres (A) Score scatter plot y (B) S-line.....112

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Medias para el contenido de Fenoles, flavonoides y capacidad captadora de radicales libres. 38
Tabla 3.1. Compuestos identificados tentativamente por (ESI) modo positivo.**¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 3.2. Metabolitos secundarios reportados en otras especies de *Lupinus*.....68

INDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	TÉRMINO
ACN	Acetonitrilo
ACP	Análisis por componentes principales
ACJ	Análisis de clústers Jerárquicos
AD	Análisis discriminante
ANOVA	Análisis de varianza simple
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmostérica
AQ	Alcaloides Quinolizídinicos
ccP	Coeficiente de correlación de Pearson
CCRL	Capacidad captadora de radicales libres
CFT	Contenido de fenoles totales
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografía liquida de alta eficiencia

CO	Componente Ortogonal
COW	Correlation Optimized Warping
CP	Componenete Principal
CV	Coeficiente de variación
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EM	Espectrometría de masas
EQ	Equivalentes de quercetina
ESI	Ionización por electrospray
ET	Equivalentes a Trolox
FC	Folin-Ciocalteu
FL	Contenido de flavonoides
FN	Fase Normal
FR	Fase Reversa
MCP	Mínimos cuadrados parciales
MCPO	Mínimos cuadrados parciales ortogonales
MS	Material vegetal seco
nm	nanométro
PTFE	Politetrafluoroetileno
RMN	Resonancia magnética nuclear
TFA	Ácido trifluoracetico
TR	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
μL	microlitro

CAPITULO 1:

Lupinus: Una visión general

1.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas cuentan con distintas estrategias de defensa que en gran medida les permiten resistir ataques de enemigos potenciales tales como herbívoros, diversos tipos de plagas, e incluso el hombre. De dichas estrategias sobresalen los denominados metabolitos secundarios, los cuales a pesar de no participar en funciones metabólicas de la planta, como los metabolitos primarios (proteínas, enzimas, entre otros), actúan en distintos procesos que permiten la supervivencia de la misma en un medio específico; de tal modo, que la función no se limita a alejar por mecanismos químicos los depredadores, sino que también participan en otras funciones como defensa intra e interespecífica, defensa contra congelación y radiación, entre otros; tal es el caso de las antocianinas, pigmentos naturales que actúan como atrayentes de polinizadores, siendo ésta una función ecológica importantísima (Taiz y Zeiger, 2006). Los metabolitos secundarios difieren de los primarios tanto en su función como en la distribución, lo que indica que un grupo de metabolitos secundarios puede predominar en una especie o género, mientras que los metabolitos primarios se extienden a todo el reino vegetal (Vega, 2001). Es así que a diario aumenta la cantidad de escritos abordando la utilidad de las plantas, por ejemplo para el tratamiento de diversas afecciones; paralelamente, el interés en las plantas ha evolucionado hacia el estudio científico de sus componentes por la actividad biológica que ellos representan, tanto para la comunidad científica, como por las personas que los emplean de manera tradicional (Marcano y Hasegawa, 2002).

Dentro de la amplia variedad de especies presentes en el territorio nacional, destaca en particular el género *Lupinus*, por ser uno de los más diversos entre la familia *Leguminosae*, que incluye árboles, arbustos e hierbas, además se encuentra en distintos ambientes alrededor de todo el globo y tiene un gran potencial agronómico, debido al alto contenido de proteína en sus semillas y su efecto positivo en la fertilidad de los suelos (Barney, 2011); el género *Lupinus* comprende alrededor de 280 especies entre anuales y perennes. La mayoría de éstas se encuentran en el nuevo mundo, con dos centros principales: en el oeste de América del Norte y en los Andes. En contraste, sólo se halla una pequeña cantidad de especies en el viejo mundo, en su mayoría en el Mediterráneo (Eastwood, Drummond, Schifino-Wittmann y Hughes, 2008). En Colombia el género se concentra en la región Andina, en altitudes por encima de los 2300 msnm (Barney, 2011).

Gran parte de la importancia de esta planta, denominada comúnmente lupino, chocho, alverjilla, tarwi o altramúz, radica en su implementación en programas de rotación de cultivos, por ejemplo como papa y cereal, ya que favorece el control de enfermedades, puede contribuir en la recuperación de suelos ácidos o con alto contenido de aluminio y ser usado como abono debido a su capacidad para fijar nitrógeno (Abadín, 2008). Por otro lado, se ha reportado su uso en diversos países como sustituto de la soja para alimentación tanto humana como animal por su alto contenido proteico, con previa eliminación de alcaloides por tratamiento físico (Lagunes, 2012). Es así que el estudio de las especies colombianas del género *Lupinus* se hace relevante frente al escaso conocimiento científico que se tiene actualmente de ellas; además, y como se ha mencionado, este género posee características tales como su capacidad de crecer en diferentes tipos de ambientes y suelos (Girón, 2005), posibilitando la recolección de muestras vegetales para su estudio en cualquier época del año en diversas regiones del país.

En la actualidad el ejercicio científico requiere de constante mejoramiento en los métodos de investigación. La tarea de la fitoquímica consiste en el estudio de los componentes químicos presentes en las diferentes especies vegetales, siendo uno de los grandes ejes de trabajo el aislamiento de las sustancias constituyentes, labor que requiere de un trabajo minucioso y extenso, puesto que el material vegetal es una matriz compleja (Guarnizo y Martínez, 2009). Sin

embargo, no solo a través del aislamiento de compuestos se puede realizar la identificación de algún componente de interés en la planta; el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido en los últimos veinte años el surgimiento de la metabolómica, una ciencia que a partir de técnicas analíticas tales como la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) o a resonancia magnética nuclear (CLAE-RMN), e incluso empleando únicamente una detección de arreglo de diodos (DAD), ha logrado extraer una gran cantidad de información acerca de las relaciones quimiotaxonómicas y ecológicas, entre otras (Mongay, 2005).

El perfilamiento cromatográfico permite establecer cambios metabólicos importantes en las muestras vegetales, conduciendo a la generación de gran cantidad de datos que para su comprensión y posterior análisis requiere de herramientas estadísticas, principalmente análisis multivariado, que incluye, aunque no se limita a, análisis por componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados o Clusters Jerárquicos (ACJ) (Mongay, 2005).

Por tanto, la presente investigación pretende establecer correlaciones químicas en el género *Lupinus*, a través de la unificación de información empleando herramientas estadísticas de análisis multivariado; con ello se consigue un aporte al conocimiento de los compuestos químicos presentes en especies colombianas de *Lupinus*, de las cuales no hay registros científicos relevantes; a la vez, se consideran posibles variaciones del metabolismo, así como la correlación entre los perfiles cromatográficos y variables cuantitativas, como contenido de fenoles o capacidad inhibidora de radicales libres.

1.2. ESTADO DEL ARTE

1.2.1. Distribución de la familia *Fabaceae*

Es una familia de tipo cosmopolita, la cual comprende un gran número de especies entre las cuales predominan las herbáceas (Grignac y Wery, 1995); estas se encuentran distribuidas en las regiones templadas y frías, y en menor proporción en las regiones tropicales, representadas principalmente por especies leñosas, estando ampliamente distribuidas en la geografía

Colombiana. La familia *Fabaceae* es la tercera en tamaño entre las Angiospermas. Cuenta con alrededor de 440 géneros y 12.000 especies; debido a esta diversidad, la familia se divide en 16 tribus. Gran cantidad de estas plantas son cultivadas y proveen parte de la dieta humana (Téllez, 1993).

1.2.2. Características morfológicas de la familia *Fabaceae*

Las fabáceas (también denominadas leguminosas) varían en hábitat de hierbas perennes y anuales a arbustos, árboles e incluso algunas plantas acuáticas, las cuales modifican su tamaño de acuerdo al ecosistema en el que se encuentren; es así que se pueden hallar desde algunas pequeñas plantas desérticas, hasta enormes árboles de bosques lluviosos; de tal manera, se caracteriza por ser una de las familias mejor adaptadas a las regiones templadas y tropicales del mundo (Wojciechowski, 2005).

Poseen hojas muy variadas, simples o compuestas; estas últimas trifoliadas, pinnadas o digitadas. Cuentan con flores hermafroditas, adaptadas a la polinización por insectos. Corola con cinco pétalos libres, las flores pueden ser solitarias o agruparse en racimos.

Frutos de tipo legumbre o nuez. Semillas arriñonadas, con testa gruesa y dos cotiledones con un alto contenido en proteína (Barney, 2011). Las especies de esta familia presentan la propiedad de enriquecer e incrementar la fertilidad de los suelos al realizar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Rhizobium* (Barney, 2011).

1.2.3. Usos etnobotánicos de la familia *Fabaceae*

Las fabáceas constituyen un recurso muy conocido y utilizado por gran cantidad de pobladores alrededor del mundo. La mayoría de las especies se aprovechan de manera silvestre, debido a que se pueden tomar directamente desde el lugar de cultivo, es decir, no requieren de un procesamiento previo para su consumo (Flores, 2006); tienen gran importancia económica por su amplia variedad de aplicaciones; tal es así que algunas especies proporcionan maderas para la

construcción, tienen aplicación en la recuperación de suelos, e incluso muchas de las especies de esta familia poseen importancia económica por la implementación de las semillas en alimentación humana, siendo un claro ejemplo de ello las habas (*Vicia*), lentejas (*Lens*), frijol (*Phaseolus*), soja (*Glycine*), maní (*Arachis*), entre otras; además de su significancia como alimento de calidad por el aporte proteico y de carbohidratos a la dieta. Muchas otras especies son usadas como plantas ornamentales, en medicina alternativa, e incluso en la industria textil y de combustibles, debido a que de ellas se extraen alcoholes, ceras, insecticidas, tintes y perfumes; muchas sirven para proteger los suelos, fijar nitrógeno y producir abono orgánico (Forero, 2005).

1.2.4. Fitoquímica y actividad biológica de la familia *Fabaceae*

Esta familia se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, presentando metabolitos secundarios de gran interés tales como alcaloides, flavonoides y polifenoles. La bioactividad de los flavonoides está asociada a su efecto antidiabético, antiinflamatorio y antimicrobiano (Martínez y otros, 2011). Otros compuestos químicos que cumplen una importante actividad biológica en la familia *Fabaceae* son los inhibidores de proteasas; estos se encuentran presentes en las semillas, constituyendo los tejidos vegetales en una composición aproximada del 5 al 15% del total del contenido de proteína. Los inhibidores de proteasas juegan un papel significativo en diferentes tejidos vegetales regulando importantes procesos enzimáticos involucrados en la germinación de las semillas, previniendo la hidrólisis de proteínas de almacenamiento (Chevreuil y otros, 2014).

1.2.5. Taxonomía del género *Lupinus*

Tabla 1.2. Clasificación taxonómica del género *Lupinus* (Lezama, 2010).

Reino	*Plantae*
División	*Magnoliophyta*
Subdivisión	*Magnoliophytina*
Clase	*Magnoliopsida*

Sub Clase	*Magnoliatae*
Súper Orden	*Rosanae*
Orden	*Fabales*
Familia	*Fabaceae*
Tribu	*Luppineae*
Género	*Lupinus L*

1.2.6. Distribución de las especies del género *Lupinus* en Colombia

En Colombia se han reportado 47 especies de *Lupinus*, localizándose principalmente en las cordilleras Central y Oriental, en los departamentos de Nariño y Putumayo, así como en el Macizo Colombiano; además se tienen registros aislados en la Sierra Nevada de Santa Marta, en la Orinoquia y en el Páramo de Frontino (departamento de Antioquia) (Barney, 2011).

1.2.7. Características morfológicas del género *Lupinus*

Las especies del género *Lupinus* son plantas herbáceas. Poseen un tallo erecto como se observa en la figura 1.1.A, su tamaño es variable, desde unos centímetros hasta casi 2 m, según la especie; son plantas dicotiledóneas anuales o perennes, herbáceas a leñosas con hojas de forma digitada, generalmente se componen por ocho a doce folíolos que varían entre ovalados a lanceolados, existiendo especies unifoliadas. El color puede variar de amarillo a verdoso. En la base del pecíolo existen pequeñas hojas estipulares, muchas veces rudimentarias. Las inflorescencias son muy vistosas, de colores variados dispuestas en espigas o en racimos, cáliz marcadamente profundo, estandarte erecto; alas connadas al ápex; quilla incurvada y enroscada dentro de las alas; 10 estambres basifijos y un ovario corto y sésil; el estilo es incurvado y glabro; estigma terminal. Las semillas son de forma aplastada u ovalada dependiendo de la especie y otras pequeñas, rugosas y de color crema a café. El fruto es una baya que contiene varias semillas de forma semejante a la de una lenteja (Munguía y Torres, 2009); cuyas partes se evidencian en la figura 1.1.B.

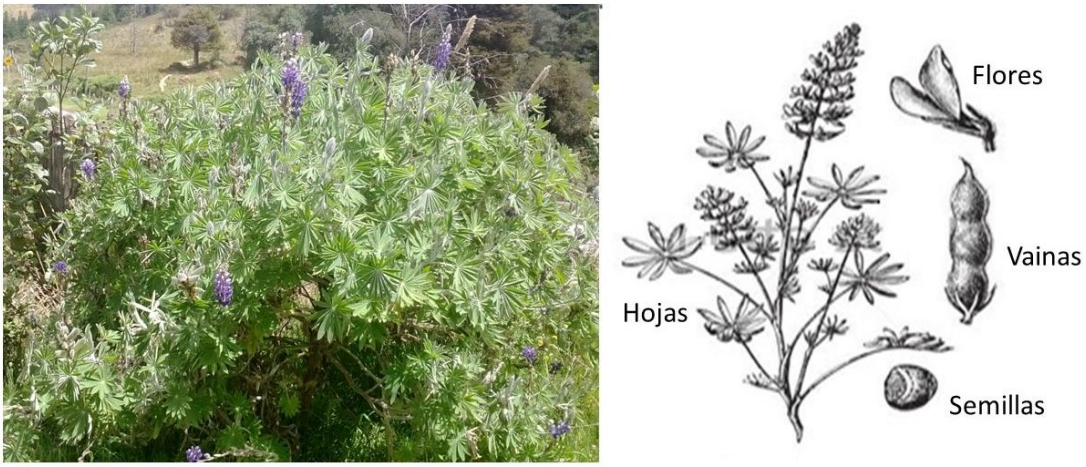


Figura 1.1. Morfología de especies de *Lupinus*; A) Foto *L. mirabilis* en Usme, Bogotá. B) Representación esquemética de las partes del lupino.

1.2.8. Usos etnobotánicos del género *Lupinus*

En Australia, Rusia, Polonia e Islandia se emplean plantas del género *Lupinus* tanto en el mejoramiento de pasturas como en el de suelos, además del uso en alimentación animal y humana; siendo las semillas la parte de la planta que se consume pero que por su alto contenido de alcaloides debe tener un tratamiento previo. Las hojas por otra parte son empleadas como emplasto para curar el sarpullido, así como de abono verde para enriquecer los suelos de producción agrícola (Guerrero, 1999). El lupino blanco o *Lupinus albus L*., originario de la región Mediterránea Europea fue cultivado desde la antigüedad para diversos usos, entre ellos, abono verde y como planta forrajera; en la actualidad la mayor parte de la producción de granos del mismo se realiza con variedades mejoradas, libres de alcaloides quinolizidínicos, y se le destina a la manufactura de alimentos balanceados para animales. En la medicina popular, a las semillas de esta especie se les atribuye la propiedad de disminuir el ácido úrico y el colesterol de la sangre. En herboristerías, negocios de productos dietéticos y farmacias se expenden también, comprimidos obtenidos de extractos puros de granos de *L. albus*. Este producto, cuyo nombre comercial es Lupines© figura en la farmacopea americana como complemento dietario que sirve para combatir la gota y el reumatismo (Planchuelo, 2007).

1.2.9. Fitoquímica y actividad biológica del género *Lupinus*

Existen dos tipos de altramuces, los "dulces" o con escaso contenido de alcaloides, si no están contaminados por micotoxinas, que pueden ser de utilidad en nutrición animal; y los "amargos" o ricos en alcaloides, que deben ser sometidos a un tratamiento previo para su uso como alimento debido a su alta toxicidad (Guerrero, 1999).

Todos los órganos de *Lupinus* pueden contener alcaloides. Estos, denominados quinolizidínicos, se concentran sobre todo en las semillas, incluyen: Esparteína, Lupanina, Anagirina, 5,6-dehidrolupanina y 13-hidroxilupanina, como los más relevantes (figura 1.2.A), pero muchos otros han sido plenamente identificados (Van Wyk y otros, 1995).

La principal función de los alcaloides quinolizidínicos es la defensa contra herbívoros (Villacres, 2009), además juegan un papel importante en interacciones planta-herbívoro, planta-microorganismo y planta-planta, las cuales pueden llegar a alterar de alguna manera la bioquímica de la planta. Este tipo de alcaloides representan una fuente alternativa de plaguicidas naturales en la agricultura para el control de plagas de interés agronómico, sin embargo, estos son específicos para cada especie, en tipo, toxicidad y niveles de concentración.

Durante las primeras etapas del desarrollo del *Lupinus* se ha observado que los alcaloides son transportados de los cotiledones al hipocótilo y a la raíz; después de dos semanas, los cotiledones ya no contienen alcaloides quinolizidínicos (AQ). Se ha propuesto la existencia de una degradación de AQ durante la germinación y que el nitrógeno es incorporado en aminoácidos y proteínas en el desarrollo de la plántula, parecido a la función de los aminoácidos no proteicos en otras fabáceas que no acumulan AQ (Reyes, 2014).

En raras ocasiones el hombre presenta intoxicación por consumo de semillas de altramúz, sin embargo pueden aparecer trastornos debido a altramuces amargos, describiéndose una sintomatología anticolinérgica: midriasis, taquicardia, hipotensión, sequedad de mucosas y retención de orina. Mientras que en animales es responsable de la lupinosis, la cual se debe a una micotoxina producida por el hongo *Phomopsis leptostromiformis* que se fija específicamente en

la tubulina de las células del parénquima hepático, dando lugar a una hepatotoxicosis; así como intoxicación, después de su ingestión se manifiestan signos neurológicos (inseguridad, caídas y convulsiones), tanto como dificultades respiratorias (Bruneton, 2001).

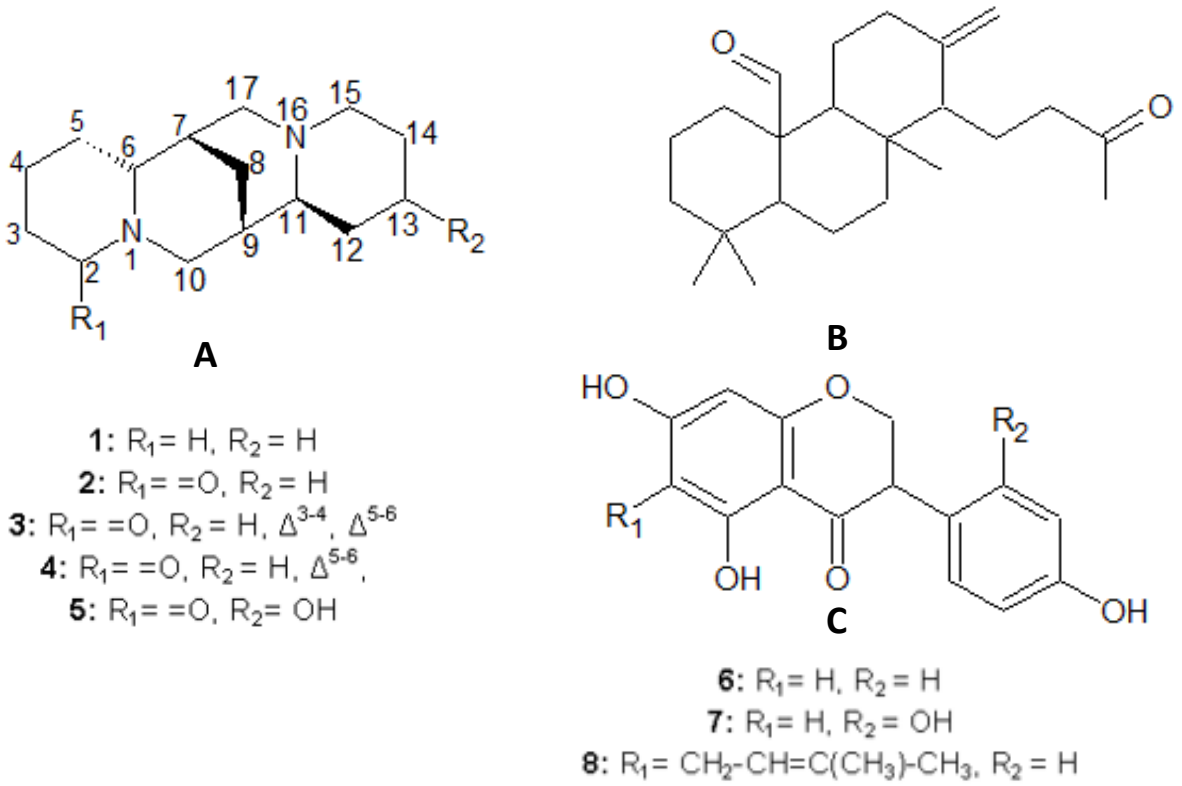


Figura 1.2. Estructura química de algunos compuestos representativos en *Lupinus.* A) Alcaloides: 1. Esparteína, 2. Lupanina, 3. Anagirina, 4. 5,6-dehidrolupanina y 5. 13-hidroxilupanina. B) Terpenoides: Luteona. C) Isoflavonas: 6. Genisteina, 7. 2'-hidroxigenisteína y 8. Wighteona

En el género *Lupinus* sobresale también la presencia de sustancias tales como taninos y oligosacáridos, y en una menor concentración de lecitinas, fitatos y saponinas (Guemes y otros, 2012). Además el estudio de diversas especies mostró la existencia de luteona cuya estructura se observa en la figura 1.2.B (Harborne, 1993). También se halló en el género *Lupinus*, gran cantidad de flavonoides del tipo isoflavona, destacándose: genisteína, 2'-hidroxigenisteína y wighteona, cuyas estructuras se encuentran en la figura 1.2.C. Estos tres compuestos se producen igualmente en las flores, tallos, raíces y vainas inmaduras de *L. albus,* y en los tallos y las raíces de L. *angustifolius* y *L. mutabilis* (Ingham, Tahara y Harborne, 1983).

Las flores de *Lupinus* tienen pigmentación variada, pudiendo ser blanca, crema, amarilla, rosa, púrpura, azul o violeta, la cual se debe a la concentración de flavonas y antocianinas presentes (Basante, 2008).

1.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Un sistema amortiguador antioxidante puede ser evaluado indirectamente como una capacidad antioxidante. Este parámetro puede ofrecer una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante cada agresor oxidativo. Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante de las muestras valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes presentes en el fluido o célula (Quintanar, 2009). De tal manera que los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles a las especies reactivas del oxígeno, gracias a su capacidad para estabilizar los radicales libres donando electrones o átomos de hidrógeno y de esta manera proteger las células (Bors y Saran, 1987). La capacidad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular (Paladino, 2011).

Si la generación de especies reactivas es alta y supera la eficacia de la defensa antioxidante del sistema, surge una condición llamada estrés oxidativo. La protección contra esta condición es alcanzada por enzimas que eliminan radicales libres tales como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. En las plantas, la capacidad antioxidante se debe fundamentalmente a la presencia de ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, antocianinas y flavonoides, cuyo contenido en la planta depende de las condiciones ambientales a las que esta se encuentre expuesta (Iglesias, 2009).

1.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Existen numerosos métodos para la cuantificación de metabolitos secundarios; la variabilidad en los resultados con la utilización de diferentes patrones y los diferentes mecanismos en las

técnicas de precipitación como por ejemplo, iterbio trivalente (Yb^{3+}) como agente precipitante de fenoles; condiciona su uso a ciertos metabolitos (Garcia, 2004). Sin embargo, debido al surgimiento de nuevas tecnologías y de instrumentos analíticos cada vez más especializados, han aparecido nuevas técnicas de cuantificación, con lo cual se puede establecer una clasificación en métodos espectrofotométricos, cromatográficos, gravimétricos y de inhibición enzimática (García, 2004).

El método más utilizado para la cuantificación de fenoles totales ha sido el propuesto por Folin y Ciocalteu, método espectrofotométrico que se basa en la reducción del ácido fosfomolíbdico a óxidos azules de molibdeno, con estados de oxidación inferiores a 7+ (Stratil, 1999).

Por su parte, la cuantificación de flavonoides se basa en las propiedades estructurales de estos compuestos, que les permiten absorber radiación en el espectro ultravioleta. El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol o etanol, específicamente con el oxígeno del grupo ceto en el carbono 4 y el oxígeno localizado en el grupo hidroxilo del carbono 5. Además, el tricloruro de aluminio forma complejos ácidos lábiles con los grupos hidroxilo en posición *orto* en el anillo A o B de flavonoides (Chang, Yang, Wen y Chern, 2002). Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituidos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. (Gómez, 2013)

La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle reactivos de desplazamiento tales como el $AlCl_3$ (empleado en el presente estudio). Este tiene la capacidad de formar quelatos con flavonoides *o*-dihidroxilados, 3-hidroxilados y 5-hidroxilados, y generar desplazamientos batocrómicos; como ejemplo de ello se encuentra el deplazamiento de 35 a 55 nm en la banda I del espectro UV-Vis, (aún en presencia de HCl) el cual podría indicar la

presencia de una flavona o un flavonol 5-hidroxilado, ahora si el desplazamiento es de 17-20 nm, se trata de una flavona o un flavonol 5-OH y 6–O; por otro lado, un desplazamiento de 50-60 nm, es indicativo de un flavonol 3-hidroxilado (Medina, 2012).

También existen reactivos con alta sensibilidad, que permiten el análisis rápido de la capacidad antioxidante de un gran número de muestras. Tal es el caso del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), cuyo método implica que el radical DPPH• de color morado oscuro con absorbancia máxima a 517 nm presente un grado de decoloración, debido a que las sustancias antioxidantes son capaces de reducir el radical DPPH• estable para formar la difenilpicrilhidrazina de color amarillo; en otras palabras, este radical, con un electrón desapareado y coloración azul-violeta, tiene la habilidad de formar una especie neutra de coloración amarillo pálido, por reacción con una sustancia antioxidante (Ramos, Castañeda e Ibáñez, 2008). Estos cambios de coloración pueden ser registrados fácilmente y correlacionados con la concentración del analito por determinar, principalmente por la técnica de absorción en el ultravioleta y visible (UV-Vis), debido a su alto grado de enlaces π, lo cual origina altos coeficientes de absortividad molar, y como consecuencia, es posible desarrollar métodos con los límites de detección y cuantificación. Los productos de estas reacciones se consideran complejos, formados a partir de interacciones no covalentes entre una molécula dadora y otra aceptora, denominados generalmente complejos de transferencia de carga o de adición (Oliveros, 2009).

1.5. QUIMIOMETRÍA

La quimiometría es una disciplina metrológica que aplica conocimientos matemáticos, en esencia estadísticos, a procesos químicos, con el fin de extraer de los datos experimentales la mayor cantidad de información y ampliar la información del sistema químico. La quimiometría permite optimizar el uso de la información al discriminarla entre relevante y de menor interés. En química analítica su objeto es mejorar cada fase del análisis para potenciar e incrementar el conocimiento de todo el proceso analítico en su conjunto (Mongay, 2005).

Dicha disciplina también utiliza métodos originados en otras disciplinas como: estadística multivariada, teoría del control, análisis numérico, investigación de operaciones, análisis de series de tiempo, y otras (Alciaturi, Escobar, Esteves y Duque, 2010), para interpretar resultados,

desarrollar modelos, y proponer mejoras en los procesos químicos. Algunas de las áreas de aplicación de la quimiometría incluyen: calibración y pruebas de significación, optimización de mediciones químicas y pruebas experimentales, y también extracción de información química a partir de datos estadísticos (Miller, 2002).

El estudio multivariado de datos comprende una serie de métodos para analizar gran cantidad de variables simultáneamente, cuando éstas presentan interdependencia (Mancera y otros, 2003). Las variables observables son homogéneas y correlacionadas, sin que alguna predomine sobre las demás. La información estadística en análisis multivariado es de carácter multidimensional, siendo la geometría, el cálculo matricial y las distribuciones multivariantes de gran importancia para este tipo de análisis. La información multivariante es una matriz de datos, pero a menudo, la información de entrada consiste en matrices de distancias o similaridades, que miden el grado de discrepancia entre los individuos (Cuadras, 2014).

El perfil cromatográfico de una planta es un sistema multivariante, tanto por la manera como los instrumentos registran las señales analíticas, como porque se representa en el perfil a la mayoría de compuestos químicos presentes en la planta. Con ayuda de la quimiometría, es posible abordar con mayor éxito dificultades como son las señales no resueltas, la gran cantidad de componentes en la planta, entre otros (Lucio, 2012).

Algunas de las técnicas quimiométricas más comunes que hacen parte del presente estudio, incluyen el método Tukey, el cual es útil para probar las diferencias entre medidas de tratamiento de un ensayo determinado; la correlación de Pearson, la cual proporciona un grado de concordancia de las posiciones relativas de los datos entre dos variables; el análisis de componentes principales (ACP) por su parte, es una técnica estadística de síntesis de la información, donde los nuevos componentes principales serán una combinación lineal de las variables originales, siendo estos independientes entre sí (Térradez, 2012). La presencia de valores atípicos tiene una influencia negativa en el modelo ACP, pero a veces son bastante fáciles de detectar en los gráficos de puntuaciones (Want y Masson 2011 citado por Isomaa, 2013). Los valores atípicos son muestras que son únicas, esto podría ser debido por ejemplo, a errores en la preparación de la muestra o la medición. Otra posibilidad es que no se haya producido ningún error, pero la muestra de valores atípicos es simplemente diferente de todo el resto. El valor atípico debe ser retirado de los datos y calculado de nuevo el modelo (Wise y

otros 2006 citado por Isomaa, 2013); por otro lado, el análisis de clústers jerárquicos (ACJ) permite agrupar variables tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos. Cada una de estas técnicas hace posible una visualización más completa de la correspondencia entre los datos y cada una de las variables de ensayo, proporcionando con ello aportes significativos al estudio (De la Fuente, 2011). Finalmente, la regresión de mínimos cuadrados parciales (MCP) es el "caballo de batalla" de la quimiometría y está relacionado con el ACP (Alciaturi, 2003). La suposición básica de la regresión MCP es que el sistema depende de un número pequeño de variables instrumentales llamadas variables latentes. Es así que este se desarrolla de modo que las primeras variables latentes sean las más importantes para explicar el vector Y en la muestra. El número de variables latentes necesarias para explicar la matriz X es una medida de la complejidad del modelo (Valdez, 2010).

El desarrollo de esta disciplina ha generado trabajos como los realizados por Kim y Park (2009) quienes han estudiado las diferencias entre dos especies de cactus a través del reconocimiento de patrones con análisis de componentes principales no supervisados. Su objetivo era establecer un método de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) para el perfil metabólico y la comparación de los flavonoides que se encuentran en las dos especies. La discriminación química de las dos especies podría ser utilizada en el control de calidad de suplementos alimenticios fabricados a partir de extractos de cactus. El conjunto de datos de perfiles metabólicos consistió en áreas de 15 picos (derivados de glicósidos de diferentes flavonoides), analizados en 34 muestras (17 muestras de cada especie) y se comparó utilizando el software XLSTAT 6.0. Por su parte, Xiang y otros (2011) han estudiado la discriminación de tres especies de *Curcuma* basado en compuestos comunes que se encuentran en sus aceites esenciales, por análisis CG-EM. El reconocimiento de patrones se realizó con base en análisis no supervisados (ACP) para distinguir efectivamente las muestras de diferentes especies y ecotipos; mientras que los supervisados fueron empleados con éxito en la clasificación de los datos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El método de reconocimiento de patrones utilizado para la clasificación fue el análisis discriminante sobre mínimos cuadrados parciales, el cual se cataloga como modelo de clasificación blando; o sea, es capaz de discernir si las muestras u objetos pertenecen a una clase, a más de una, o a ninguna (Comesaña y otros, 2009).

1.6. REFERENCIAS

- Abadín, J. (2008). *Agricultura sostenible en los Andes Tropicales. Importancia de la materia orgánica en la conservación de la fertilidad del suelo*. Tesis de doctorado. España: Universidad Santiago de Compostela. pp.32-33.
- Adler, L., y Kittelson, P. (2004). Variation in Lupinus arboreus alkaloid profiles and relationships with multiple hervibores, *Biochemical Systematics and Ecology, 21*, 371-392.
- Alciaturi, C., Escobar, M., De La Cruz, C., y Rincon, C. (2003). Partial least squares (PLS) regression and its application to coal analysis. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia, 26*(3), 197-204.
- Alciaturi, C., Escobar, M., Esteves, I y Duque, Z. (2010). The application of mathematical and statistical methods in industry, *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia, 33*(2), 164-168.
- Barney, V. E. (2011). *Biodiversidad y ecogeografía del género Lupinus en Colombia*. Tesis de Maestría. Universidad nacional de Colombia. Palmira. pp.5-14.
- Basantes, F. A. (2008). *Influencia de los tratamientos químico y biológico sobre la germinación, producción y vigor en semillas de arveja y chocho.* Tesis de grado Latacunga, Ecuador: Universidad técnica de Cotopaxi. p. 11
- Bors, W y Saran, M. (1987). *Radical scavenging by flavonoid antioxidants*, *Free Radical Research Communications*. 2(*4-6*), 289-294.
- Bruneton, J. (2001). *Plantas tóxicas: Vegetales peligrosos para el hombre y los animales.* Zaragoza, España: Ed. ACRIBIA, S.A. pp. 289-29.
- Cañibano, M. (2012). *Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos.* Tesis de Maestría. Universidad de Valladolid. Palencia. p. 103.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*, *Journal of Food and Drug Analysis, 10(*3*)*, 178-182.
- Chevreuil, L., Carvalho, J., Calderón, L., Souza, L., Pando, S., & Borges, E. (2014). *Partial purification of trypsin inhibitors from Parkia sedes (Fabaceae), Revista Hoehnea*, 41(2), 181-186.

- Colina, J., Torres, A., & Hernandez, G. (2009). α-galactosides content and antioxidant capacity of Cageon Pea (Cajanus cajan) and Lupinus (Lupinus sp) seeds grown in Venezuela, *Revista de la Facultad de Agronomia*, 18(*18*), 1-5.
- Comesaña, Y., Morales, A., Talavera, I., y Fernández, R., y Porro, D. (2009). *Comparación de dos métodos supervisados de reconocimiento de patrones para la clasificación de destilados medios de petróleo mediante Espectroscopia Infrarroja*, Revista CENIC Ciencias Químicas, *40*(2), 89-94.
- Cuadras, C. (2014). Análisis De Componentes Principales. *Nuevos métodos de análisis multivariante.* (pp. 77-92). Barcelona, España: CMC Editions.
- De la Fuente, S. (2011). *Análisis Conglomerados*. Facultad de ciencias económicas y empresariales. Madrid, España. Consultado [03/08/15]. Disponible en: http://www.fuenterrebollo.com/Economicas/ECONOMETRIA/SEGMENTACION/CONGLOMERADOS/conglomerados.pdf
- Doughari, J. (2012). Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. *En: Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. (pp. 1-32). Department of Microbiology, School of Pure and Applied Sciences, Federal University of Technology. Yola, Nigeria.
- Eastwood, R. J., Drummond, C. S., Schifino-Wittmann, M. T y Hughes, C. E. (Septiembre, 2008). *Diversity and evolutionary history of lupins – insights from new phylogenies.* Trabajo presentado en la 12th international lupin conference del 14 al 18 septiembre. Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. Consultado [24/04/16]. Disponible en: http://www.lupins.org/ppt/conference/2008/Tuesday_0830_Colin_Hughes_Diversity_Evolutionary_History_Lupins.pdf.
- Flores, J. (2006). *Floristica y etnobotánica de las Leguminosas.* Consultado [24/04/16]. Disponible en: http://www.seduma.yucatan.gob.mx/biodiversidad-yucatan/04Parte3_Usos_Biodiversidad/Capitulo7/02Floristica_etnobotanica_leguminosas.pdf.
- Fuertes, C., Roque, M y Tristan, M. (1998). Flavonoides y alcaloides de Lupinus ballianus c.p. smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Revista Ciencia e Investigación*, *1*(2), 1-10.

- García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 27(*1*), Central España Republicana, Matanza, Cuba, 1-12.
- Galbis, J., (2004). *Diseño de Nuevo fármacos: Productos Naturales*. Panorama actual de la química farmacéutica. (pp. 205-212). Sevilla, España: Secretariado de publicaciones de la universidad de Sevilla.
- Girón, J. (2005). *Toxicos y antinutritivos en fuentes protenicas de origen vegetal*. (pp. 371-384). España: Universidad de Sevilla.
- Gómez, M. (2013). *Flavonoides.* Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ingenieria Química. (pp. 11). Perú: Trujillo
- Grignac, P., y Wery., J. (1995). La familia Leguminoseae. *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa-Rhizobium.* (pp. 20-27). Roma: Food & Agriculture Org.
- Guarnizo Franco, A., & Martínez Yepes, P. (2009). Extracción líquido-líquido de la cafeína. *Experimentos de Química Orgánica*. (p. 81). Colombia: ELIZCOM S.A.S.
- Guemes, N., Martínez, J., Hernandez, J., Yanez, J., & Totosaus, A. (2012). Comparison of Chemical Composition and Protein Digestibility, Carotenoids, Tanins and Alkaloids Content of Wild Lupinus Varieties Flour. *Pakistan Journal of Nutrition, 11*(8), 676-682.
- Guerrero, A. (1999). *Altramuz.* Cultivos herbáceos extensivos. (pp. 639-693). España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Harborne, J. (1993). *Higher Plant-Lower Plant Interactions: Phytoalexins and Phytotoxins*. En: Introduction to Ecological Biochemistry. (pp. 264-294). California, USA: Elsevier Ltd.
- Iglesias, J. (2009). *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*, (pp. 69-70), España: Universidad Santiago de Compostela.
- Ingham, A., Tahara, S., & Harborne, J. (1983). Fungitoxic Isoflavones from Lupinus albus and other Lupinus Species, *Zeitschrift für Naturforschung Online, 19*, 194-200.
- Kim, H., y Park. (2009). Metabolic profiling and discrimination of two cacti cultivated in Korea using HPLC-ESI-MS and multivariate statistical analysis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,* 52 (*4*), 346-352.

- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2003). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry,* 85, 633–640.
- Lagunes, L., Upton, J., Garcia, E., Mata, J., (2012). Morphological diversity and protein concentration of Lupinus spp. In central – Eastern región of the state of Puebla, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 99, 73-90.
- Lezama, P. B. (2010). *Las Especies de Lupinus L. (Fabaceae) y de sus simbiontes en el distrito de Corongo-Ancash.* Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. p 35.
- Lucio, J (2012). *Aplicación de métodos quimiométricos para la caracterización y control de calidad de plantas medicinales*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. p. 15.
- Mancera, J., Peña, E., Giraldo, R., y Santos, A. (2003). *Introducción a la modelación ecológica*, (p. 51), Colombia: Universidad Nacional.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*, (p.30), Editorial Torino: Caracas, Venezuela.
- Martínez, M., Ocampo, D., Galvis, J., y Valencia, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de Bauhinia variegata L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales,* 16(*4*), 313-323.
- Medina, M., (2012). *Flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad*, Universidad Austral de Chile, Facultad de ciencias, Escuela de química y farmacia, Trabajo de grado, Chile: Valdivia.
- Miller, J., y Miller, J. (2002). *Análisis Multivariante*. Estadistica y quimiometría para química analítica. (pp. 221-244). España: Pearson educación S.A.
- Mongay, C. (2005). *Quimiometría.* (p. 19). España: Universidad de Valencia.
- Munguía, S. S., y Torres, J. (2009). *Plantas herbaceas y vivaces*. Historia de las plantas en el mundo antiguo. (pp.267-315) Bilbao, Madrid: Universidad de Deusto. Consejo superior de investigaciones científicas.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., & De la Cuadra, C. (1993). Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas I: Alcaloides. *Investigacion Agraria: Produccion y Proteccion Vegetales, (*8*)*. 351-361.

- Oliveros, A., Ceferino, A. (2009). *Estudio por espectrofotometría uv-vis de la reacción entre los iones cianuro y picrato. Un ejemplo práctico de aplicaciones analíticas y estudios cinéticos*. Revista Colombiana de Química, Vol 38, número 1. Bogotá Colombia.
- Oomah, D., Tiger, N., Olson, M & Balasubramanian, P. (2006). *Phenolics and Antioxidative Activities in Narrow-Leafed Lupins (Lupinus angustifolius). Plants foods for human nutrition.* 61(*2*). 86-92.
- Paladino, C. (2011). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en semillas de la vid (Vitis vinifera).* (Tesis de Maestría). Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. p. 13.
- Planchuelo., A. (2007). Evaluación de los usos medicinales de las semillas de lupino blanco *(Lupinus albus L.).* Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas. *6* (5). 213-214.
- Quintanar, M., y Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. *28* (3). 89-101.
- Ramírez, C. (2009). *Aplicación de las semillas de Lupinus mutabilis.* Consultado: [09/08/2015] Disponible en: http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/854/1/P-SENESCYT-0018(1).pdf
- Ramos, E., Castañeda, B., y Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Peru Salud, 15* (1), 42-46.
- Reyes, L. (2014). Efecto biológico de plantas de *Lupinus campestris* cultivadas in vitro e inducidas con metil jasmonato sobre *Spodoptera frugiperda.* Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Mexico. p.5.
- Rouessac, A., (2003) *Análisis químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas.* (p. 105). Madrid, España: Ediciones Mc Graw Hill.
- Sistema de información sobre Biodiversidad de Colombia. (2015). *Biodiversidad en cifras.* Consultado: [14/07/2015] Disponible en: http://www.sibcolombia.net/web/sib/.
- Siger, A., Czubinski, J., & Kachlicki, P. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species, *Journal of food composition and analysis, 25*(2), 190-197.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). *Metabolitos secundarios y defensa en las plantas*. Fisiología vegetal. (pp. 529-575). Castellón de la Plana, España: Universitat Jaume I.

- Téllez, O. (1993). *Flora del valle de Tehuacán–Cuicatlán.* México: UNAM.
- Terradez, M. (2012). *Análisis de componentes principales (PCA)*. UOC. Consultado: [03/08/15] Disponible en:http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf.
- Valdez, D. (2010). Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales. *Revista Varianza*, *7*(5), 18-22.
- Valero, E. (1993). Evolución de la polifenol oxidasa durante la maduración de la uva y la elaboración del vino, *Caracterización Cinética de la Polifenol Oxidasa de Uva Airen: Efecto de Inhibidores* (p. 59). España: Univ de Castilla-La Mancha.
- Van Wyk, B., Grelnwaldt, R., & Wittes, L. (1995). Alkaloid Variation in the *Lupinus pusillus* group (Fabaceae: tribe Genisteae), *Biochemical Systematics and Ecology*, *23*(5), 533-537.
- Vega, M. (2001). *Etnobotánica de la Amazonia peruana* (p. 50). Quito, Ecuador: Ediciones Abya-Yala.
- Villacrés, E., Peralta, E., Cuadrado, L. (2009). *Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del Chocho.* (p. 6). Quito, Ecuadro. Ediciones Paoron.
- Wojakowska, A., Piasecka, A., & García, P. (2013). Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC-MS techniques, *Phytochemistry*, *92 (3)*, 71-86.
- Wojciechowski, M., Mahn, J., & Jones, B. (2005). Fabaceae. Legumes. Consultado: [10/08/15] Disponible en: http://tolweb.org/Fabaceae/21093
- Xiang, Z., Wang, X., Cai, X. y Zeng, S. (2011). Metabolomics Study on Quality Control and Discrimination of Three*Curcuma* Species based on Gas Chromatograph–Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 22 (*5*), 411-418.

CAPÍTULO 2:

Variabilidad química y capacidad captadora de radicales libres de especies de *Lupinus*

2.1. INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido el uso empírico de las plantas en tratamientos para diversas enfermedades en múltiples culturas alrededor de mundo, transmitido a través de generaciones. Tal saber tradicional ha sido perfeccionado con el tiempo, tamizado gracias al rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos en busca de los principios activos para explicar racionalmente el uso terapéutico de una planta, favoreciendo así la vigencia de su empleo. No todas las especies vegetales cuentan con este tipo de estudio; muchos aspectos permanecen empíricos, lo cual es una limitante para seleccionar los componentes bioactivos. De tal manera que no es posible asociar el uso tradicional de una especie vegetal determinada con la presencia de algún tipo de compuesto (Muñoz, 2001).

Pese a ello, dentro del estudio de los productos naturales se ha venido resaltando una amplia variedad de compuestos denominados polifenoles, que por su poderosa capacidad antioxidante (O'Gorman, 2003) previenen procesos trombóticos, arterioscleróticos y carcinógenos (Aranceta, 2006); también son desinfectantes, antisépticos urinarios y diuréticos (Barrera, 2004). Estos son sintetizados por las plantas en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Su estructura molecular se caracteriza por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, permitiendo la existencia de varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos, flavonoides (Vázquez, De Cos Blanco, y López, 2005) y taninos (Ingham y otros, 1983).

Es así, que como producto del metabolismo secundario de la familia *Fabaceae* se ha obtenido e identificado gran cantidad de polifenoles; se destacan Cerca de unos 8000 compuestos fenólicos en material de origen vegetal (Porras, 2009). Como un subgrupo de los polifenoles se hallan los flavonoides, cuya bioactividad se asocia al efecto antidiabético, antiinflamatorio y antimicrobiano que ostentan (Martínez y otros, 2011). Esta familia además proporciona maderas para la construcción, plantas ornamentales, medicina e incluso su uso se extiende a aplicaciones industriales (Forero, 2005). Dentro de los usos medicinales predominan por las propiedades antidiarreicas y antihelmíticas (Osuna, 2005). Sus aplicaciones se deben a la variedad estructural dentro del mismo grupo de metabolitos secundarios y está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxilación, malonilación, esterificación y la glucosilación. Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, lo cual es parte de la estrategia de adaptación de la misma; dichos cambios químicos se relacionan generalmente por las condiciones del hábitat en donde se encuentre la planta; entre ellos se destaca la temporada climática de la zona, cercanía a fuentes hídricas, exposición a situaciones antropogénicas, presencia de la fauna de la región, así como otros factores que pueden afectar el metabolismo vegetal (Sepulveda y otros, 2003).

La variabilidad de la familia *Fabaceae* es extendida por los niveles taxonómicos que comprende la misma; por ejemplo, el género *Lupinus*, que se ha caracterizado por contener alcaloides quinolizidínicos (Van Wyk y otros, 1995), flavonoides, isoflavonas, terpenoides, taninos, lecitinas, fitatos y saponinas (Ingham, 1983). A pesar de ser abundante en diferentes regiones de Colombia (según datos del Herbario Nacional Colombiano) y conocida por sus usos tradicionales, no dispone de información sobre los componentes fenólicos, así como de capacidad antioxidante.

Por consiguiente, el presente trabajo será pionero en generar información acerca de los metabolitos más representativos en este género realizando para ello un perfil químico de diferentes especies de *Lupinus* a través de la determinación de su variabilidad química, específicamente a nivel del contenido de fenoles totales y flavonoides, así como en capacidad captadora de radicales libres, en sus extractos etanólicos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. General

Para los métodos de análisis en general se usó etanol destilado, reactivo Folin-Ciocalteu (FC) Merck al 10%, Na_2CO_3 al 7,35%, $AlCl_3$ al 10%, CH_3COONa 1,36% y una solución del radical estable DPPH•. Los datos fueron obtenidos usando un espectrofotómetro Genesys 10S UV/Vis y medidos en celdas de poliestireno con paso óptico de 10 mm. El desarrollo experimental se realizó completamente en el Laboratorio de Química Bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada, sede Campus (km 2 vía Cajicá-Zipaquirá).

2.2.2. Selección del material vegetal

Para la selección de las especies se tuvo en cuenta su abundancia en Cundinamarca y cercanía con la capital colombiana, además su capacidad invasiva y la escasa cantidad de estudios similares. Se realizó una búsqueda detallada y centrada en el género, sobre los reportes de avistamientos en la base de datos del Herbario Nacional Colombiano.

2.2.3. Recolección y clasificación del material vegetal.

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, en los lugares indicados en la figura 2.1, durante los meses de agosto de 2013 a septiembre de 2015, contando un total de 47 accesiones, correspondientes a 39 especímenes. Cada espécimen fue marcado con un número entero consecutivo desde 1 hasta 39 en orden de adquisición. Algunas accesiones además correspondieron a iguales especímenes durante diferentes épocas de colecta. Para tales muestras, el número del espécimen desde la segunda colecta se acompaña por una letra partiendo de la A, en orden alfabético.

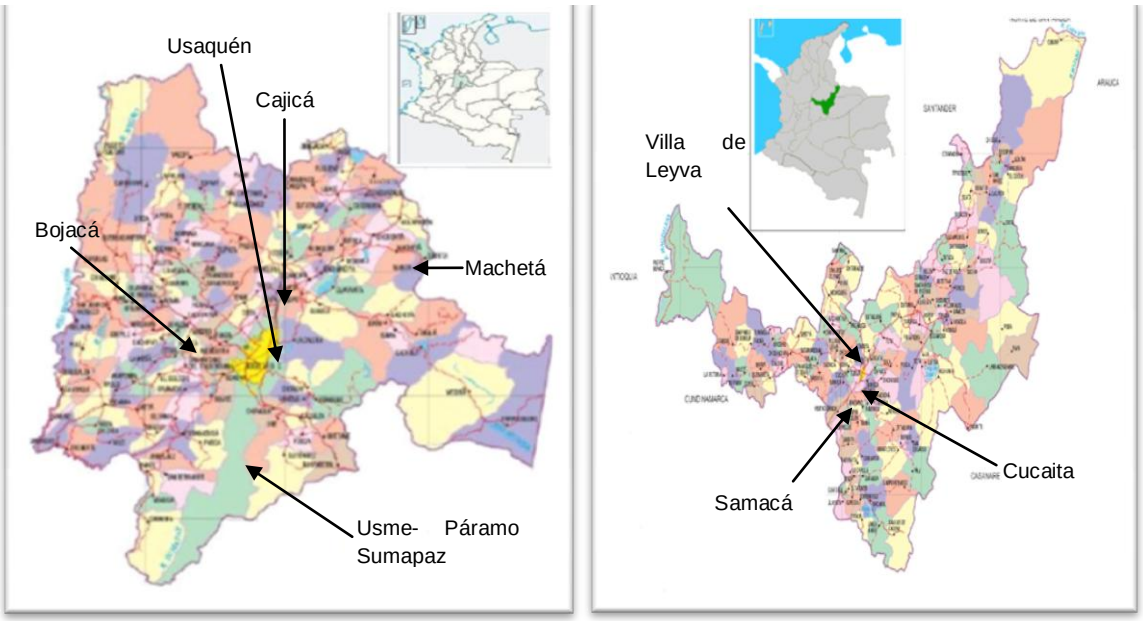


Figura .2.1. Ubicación de las muestras colectadas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá.

La identificación taxonómica se realizó por los biólogos A. Jara y C. Parra, en el Herbario Nacional Colombiano. Las especies clasificadas fueron: *L. amandus* (*a*), *L. bogotensis (b), L. guascensis (g), L. humifusus (h), L. mirabilis (m) y L. pubescens (p)*, pertenecientes al género *Lupinus* y a la familia *Fabaceae*. Siendo *L. amandus* un sinónimo de *L. bogotensis* según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (2012). Las letras entre paréntesis serán usadas para identificar las especies en las gráficas del presente capítulo.

En la tabla 2.1 de anexos se observan en detalle las partes colectadas en cada accesión, nombre de la especie clasificada y lugar de colecta.

2.2.4. Preparación de extractos

Se tomó independientemente 0,4 g de muestra seca y molida (hojas, tallos, flores, vaina o semillas). A cada muestra se adicionaron 7 mL de etanol y el conjunto se sometió a ultrasonido durante 30 min a temperatura ambiente; posteriormente se filtró, colectando en balón aforado. El proceso se repitió dos veces más, usando 3 mL de etanol. El material residual se lavó con pequeñas porciones de etanol para asegurar transferencia cuantitativa; la solución obtenida se transfirió a viales tapa rosca y se conservó en nevera a 4°C. En total se prepararon soluciones etanólicas de 196 muestras (diferentes partes de cada una de las 47 accesiones).

2.2.5. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT).

La cuantificación de fenoles totales en los extractos etanólicos se realizó por el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo a la metodología descrita por Cañibano (2012) con las modificaciones establecidas por el Laboratorio de Química Bioorgánica de la UMNG. En una celda se tomó 200 μL de muestra apropiadamente diluida, se adicionó 400 μL de reactivo FC al 10% y se dejó en reposo durante 3 min; posteriormente se agregó 1500 μL de Na_2CO_3 al 7,35%, tras lo cual se mantuvo en reposo y oscuridad por un periodo de 2 h; después de este tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Cada medición se realizó con tres réplicas. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de material vegetal seco (mg EAG/g MS), empleando una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración de ácido gálico usado como patrón ($y = 0,0779x + 0,0137$ con un R^2 de 0,9994).

2.2.6. Determinación del contenido de flavonoides (FL).

El método espectrofotométrico de $AlCl_3$ se usó en la determinación de flavonoides (Chang y otros, 2002) según las modificaciones validadas en el Laboratorio de Química Bioorgánica de la UMNG. Se tomó 1000 μL de muestra apropiadamente diluida, se adicionó 800 μL de etanol, se agregó 200 μL de $AlCl_3$ al 10% y 200 μL de CH_3COONa al 1,36%; posteriormente se dejó en reposo en la oscuridad durante 40 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Cada medición se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por g de material vegetal seco (mg EQ/g MS), empleando una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración de quercetina patrón ($y = 0,0573x - 0,0242$ con un $R^2 = 0,9988$).

2.2.7. Método de DPPH para la capacidad captadora de radicales libres (CCRL).

La determinación de la capacidad captadora de radicales libres es usada como medida de la capacidad antioxidante, esta medición en los diferentes extractos vegetales se llevó a cabo utilizando el radical estable DPPH•, siguiendo el método reportado por Kulisic, Radonic, Katalinic y Milos (2003) con algunas modificaciones previamente adecuadas para las muestras

de interés. Para ello, alícuotas de cada extracto se llevaron a sequedad; el residuo se pesó y redisolvió en un volumen exacto de etanol, obteniendo soluciones de concentración conocida. A 50 μL de la solución de muestra apropiadamente diluida, se agregó 1950 μL de reactivo DPPH con absorbancia cercana a 1; luego de 1 h en reposo y oscuridad se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. Cada medición se realizó con tres réplicas. Los resultados fueron expresados como concentración mM equivalente a Trolox por mg de extracto seco (mM ET/mg ES), empleando una curva de calibración de la concentración de Trolox (mM) en función del porcentaje de inhibición (y=1,6542x -0,1236 y un R^2= 0,9995). Al inicio de cada set de medidas se estableció una absorbancia control para el blanco de reactivos (mezcla de 50 μL de etanol y 1950 μL de reactivo DPPH).

2.2.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por los diferentes métodos de cuantificación anteriormente mencionados (CFT, FL y CCRL) se compararon por cada órgano. Posteriormente a cada variable se le realizó una prueba de análisis de varianza simple (ANOVA) con el fin de determinar diferencias significativas entre cada muestra según el órgano de estudio y una prueba de Tukey, para establecer agrupaciones entre muestras según las diferencias significativas observadas. Para finalizar, se construyó una gráfica de correlación con los datos obtenidos en los ensayos realizados y se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson correspondientes. Para estos análisis se usó el software estadístico Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), licencia estudiantil.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se encuentran los resultados obtenidos de los métodos cuantitativos aplicados a los extractos etanólicos de hojas, tallos, flores, vainas y semillas de las especies del género *Lupinus*, con sus correspondientes análisis.

2.3.1. Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante

Tabla 2.1. Medias para el contenido de Fenoles, flavonoides y capacidad captadora de radicales libres.

Parte	CFT[a] (mg EAG/g MS)	FL[a] (mg EQ/g MS)	CCRL[a] (mM ET/mg ES)
Hojas	5,15 (40,6%)	1,50 (42,1%)	193,23 (76,8%)
Tallos	2,25 (55,9%)	0,27 (63,8%)	130,22 (42,1%)
Flores	3,80 (31,7%)	0,58 (62,4%)	169,20 (81,2%)
Vainas	1,91 (39,8%)	0,16 (40,3%)	159,82 (39,9%)
Semillas	2,43 (28,5%)	-	20,05 (36,7%)

[a]Concentración media (coeficiente de variación)

La tabla 2.1 presenta los valores medios en cada ensayo, siendo hojas la de mayor contenido en los tres métodos, vainas la menor en CFT y FL, finalmente para la CCRL semillas registró la menor capacidad. Para cada parte se calculó su respectivo coeficiente de variación porcentual (%CV); en todos los resultados de la tabla 2.1 su %CV es evidencia de una heterogeneidad de los promedios en las variables analizadas, por ende a lo largo del capítulo será apreciable la variabilidad entre las muestras frente a su CFT, FL y CCRL y cada una de las partes de la planta; a través del análisis de varianza simple (ANOVA) se busca comprobar que al menos uno de los promedios es estadísticamente diferente y partiendo de ello con una prueba de Tukey definir los grupos que son considerados iguales en términos estadísticos.

Cabe resaltar que la relación existente entre capacidad antioxidante y su expresión en equivalentes Trolox representa la concentración del extracto que tiene la misma capacidad captadora de radicales libres que la solución del reactivo trolox, con el objetivo de comparar los resultados de capacidad antioxidantes de los extractos vegetales (Tovar. 2013), que se obtuvieron mediante la inhibición del radical DPPH•.

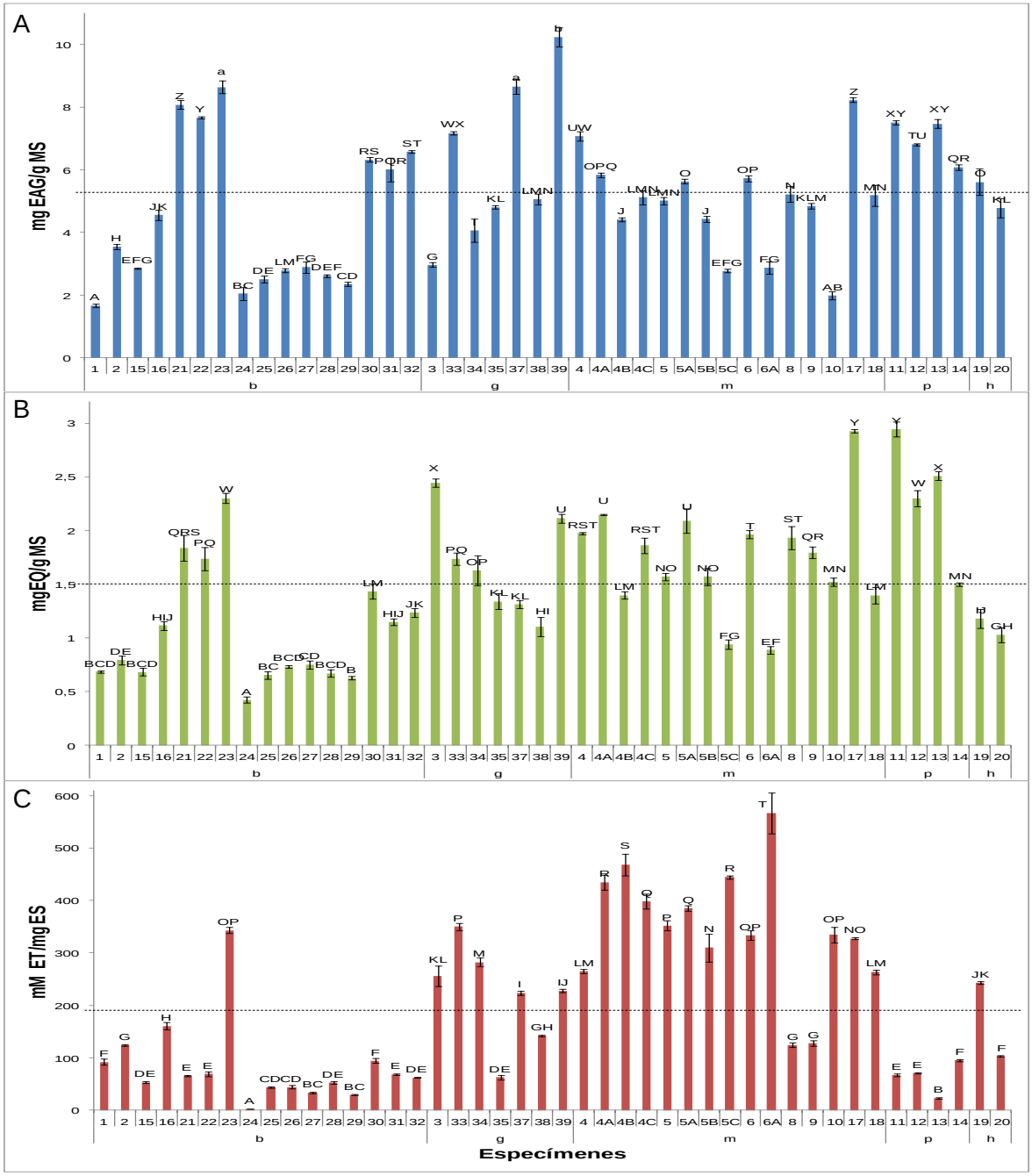


Figura 2.2. Variabilidad química en hojas de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. La línea punteada indica la media para cada caso.

En la figura 2.2 se encuentran los resultados de las determinaciones cuantitativas con los especímenes ordenados según su especie; es posible observar que, en general, no existen comportamientos definidos entre los individuos de cada especie; los contenidos de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante presentaron alta variabilidad entre los individuos de cada especie, así como al comparar entre especies (la información puntual empleada para originar las gráficas se encuentra en la Tabla 2.4-Anexos).

Por tanto, se realizó una observación más detallada del comportamiento presentado por los individuos de cada especie, iniciando con los especímenes de *L. bogotensis,* en ellos se evidencia un comportamiento similar entre fenoles, flavonoides y CCRL, es decir, una tendencia particular o una aparente relación. El CFT fue muy variable, siendo la muestra **1** aquella con el menor contenido (1,67 ± 0,06 mg EAG/g MS) y la muestra **23**, con 8,64 ± 0,20 mg EAG/g MS, la de contenido más elevado; con excepción del especímen **23** (343,34 ± 5,35 mM ET/mg ES), las muestras de *L. bogotensis* presentaron baja CCLR, comparada con la media global de las hojas (193,23 mM ET/mg ES), mientras que la capacidad más baja fue la de la muestra **24** con 1,89 ± 0,06 mM ET/mg de ES; las muestras **23** y **24** fueron las de mayor y menor FL, respectivamente.

Los especímenes de *L. guascensis*, mostraron un comportamiento variable; la muestra **3** presentó el menor CFT con 2,97 ± 0,08 mg EAG/g MS, mientras que la muestra **39** mostró el mayor contenido, no sólo en la especie sino en todos los especímenes (10,23 ± 0,30 mg EAG/g MS); en cuanto al FL, la muestra **3** mostró la mayor cantidad con 2,44 ± 0,04 mg EQ/g MS, en tanto que la **38**, con 1,10 ± 0,09 mg EQ/g MS, tuvo el menor contenido; la diferencia más notoria con *L. bogotensis* fue en la capacidad captadora de radicales libres, presentando mayores valores (cerca de 2,5 veces más) la especie *L. guascensis*. Las muestras de *L. mirabilis* presentaron la mayor capacidad de inhibir radicales, exceptuando las muestras **8** y **9**, provenientes de Cajicá, con valores de 124,34 ± 3,99 y 127,78 ± 5,06 mM ET/g ES, en las cuales a pesar de tener una cantidad representativa de fenoles totales su CCRL es menor a la media, contrario a lo reportado por Ciappini (2013) donde se atribuye la capacidad antioxidante a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente a aquellos de tipo flavonoide. En las especies *L. pubescens y L.*

humifusus el CFT fue mayor a la media de las hojas para este ensayo (5,15 mg EAG/g MS); en contraste, los valores para contenido de flavonoides en *L. humifusus* estuvieron por debajo del promedio correspondiente a 1,50 mg EQ/g MS; algunas de las accesiones de *L. pubescens* presentaron los valores más elevados para flavonoides entre todas las muestra presentadas en la figura 2.2.B y en cuanto a CCRL para la misma especie, los valores se hallaron debajo de la media global, salvo por la muestra **19** con 243,24 ± 2,32 mM ET/g ES.

La prueba de Tukey para fenoles totales discriminó las muestras en 27 grupos de un total de 44 muestras analizadas, lo cual es un indicativo de que la variabilidad estadística mostrada entre los especímenes es alta, debido a que gran cantidad de grupos fueron formados por 3 a 4 muestras. Al estudiar la variabilidad entre especímenes de una especie se hace aún más evidente, un ejemplo de ello, es lo mostrado por las especies de *L. bogotensis* y *L. pubescens*, entre las cuales se hallaron grupos con valores similares en términos estadísticos, teniendo como ejemplo los formados por las muestras **25** y **28** (*b*), **15** y **27** (*b*), así como las muestras **11** y **13** (*p*); los demás grupos fueron conformados por una única muestra.

Para el caso de flavonoides, el ensayo de Tukey mostró 22 grupos, de los cuales se tienen como ejemplo de agrupaciones en la especie *L. bogotensis*, se obtuvieron las siguientes tres con promedios estadísticamente similares: **1**, **15**, **25** y **28**, también **2**, **26** y **27**, por último las muestras **16** y **31**; en la especie *L. guascensis* las muestras **35** y **37** no fueron significativamente diferentes según las pruebas estadísticas, mientras que en *L. pubescens* y *L. humifusus* no se halló ninguna similitud entre el FL en cada especie.

Finalmente con los resultados obtenidos para la CCRL en *L. bogotensis* predominó la formación de varios grupos, tales como: **1** y **30**, el conformado por **15**, **28** y **32**; particularmente, se encontró que las hojas de **21**, **22** y **31**, muestras colectadas exactamente el mismo día, no presentaron diferencias significativas en su capacidad captadora de radicales libres (grupo E, prueba de Tukey). Para *L. guascensis* se formó un único grupo con las muestras **37** y **39**, de igual

manera con *L. pubescens* y las muestras **11** y **12**. De tal manera se evidencia que la CFT, FL y capacidad captadora de radicales libres pueden verse afectados por múltiples factores y ser independientes del lugar y fecha de colecta, puesto que sólo una de las agrupaciones mencionadas previamente fue colectada la misma fecha y en ninguna se presenta relación con el lugar de procedencia.

A fin de evaluar el efecto de la temporada sobre CFT y la capacidad captadora de radicales libres, se llevó a cabo el análisis de cuatro muestras de *L. mirabilis*, las cuales fueron sometidas a muestreo en diferentes épocas del año, contando así con las muestras **4**, **4A**, **4B**, **4C**, **5**, **5A**, **5B**, **5C**, **6**, **6A**, **10** y **10A**. La especie se seleccionó teniendo en cuenta la ubicación geográfica y la disponibilidad de material vegetal (fácil acceso y gran porte). Los resultados obtenidos con los tres métodos de análisis (fenoles, flavonoides y CCRL) mostraron alta variabilidad, según se demostró estadísticamente, por lo cual se puede decir que existe un efecto de la temporada de colecta sobre la composición química de esta especie; tan solo se encontraron algunos grupos coincidentes en contenido de fenoles totales y época de colecta. El test de Tukey indicó las siguientes agrupaciones de acuerdo al CFT: **4A**, **5A** y **6** (colectados en la misma fecha), así como **4B** y **5B** (colectado en la misma fecha), **4C** y **5** (diferente fecha de colecta), otro grupo fue formado por **5C** y **6A** (misma fecha de colección). De igual manera, se evidenciaron grupos según FL, así: **4**, **6** y **8**, **4A** y **5A** (colectadas la misma fecha), y **5** con **5B** (cinco meses entre una colecta y otra); por su parte, la prueba de Tukey generó 5 grupos por el método del DPPH; estos fueron: **4** y **18**, **4A** y **5C** (seis meses entre cada colecta), **4C** y **5A** (seis meses entre cada colecta), finalmente **8** y **9** (colectadas el mismo día en la sede campus UMNG); es así que para la CCRL no se obtuvieron las mismas agrupaciones que en CFT, además de menor relación según la época de colecta.

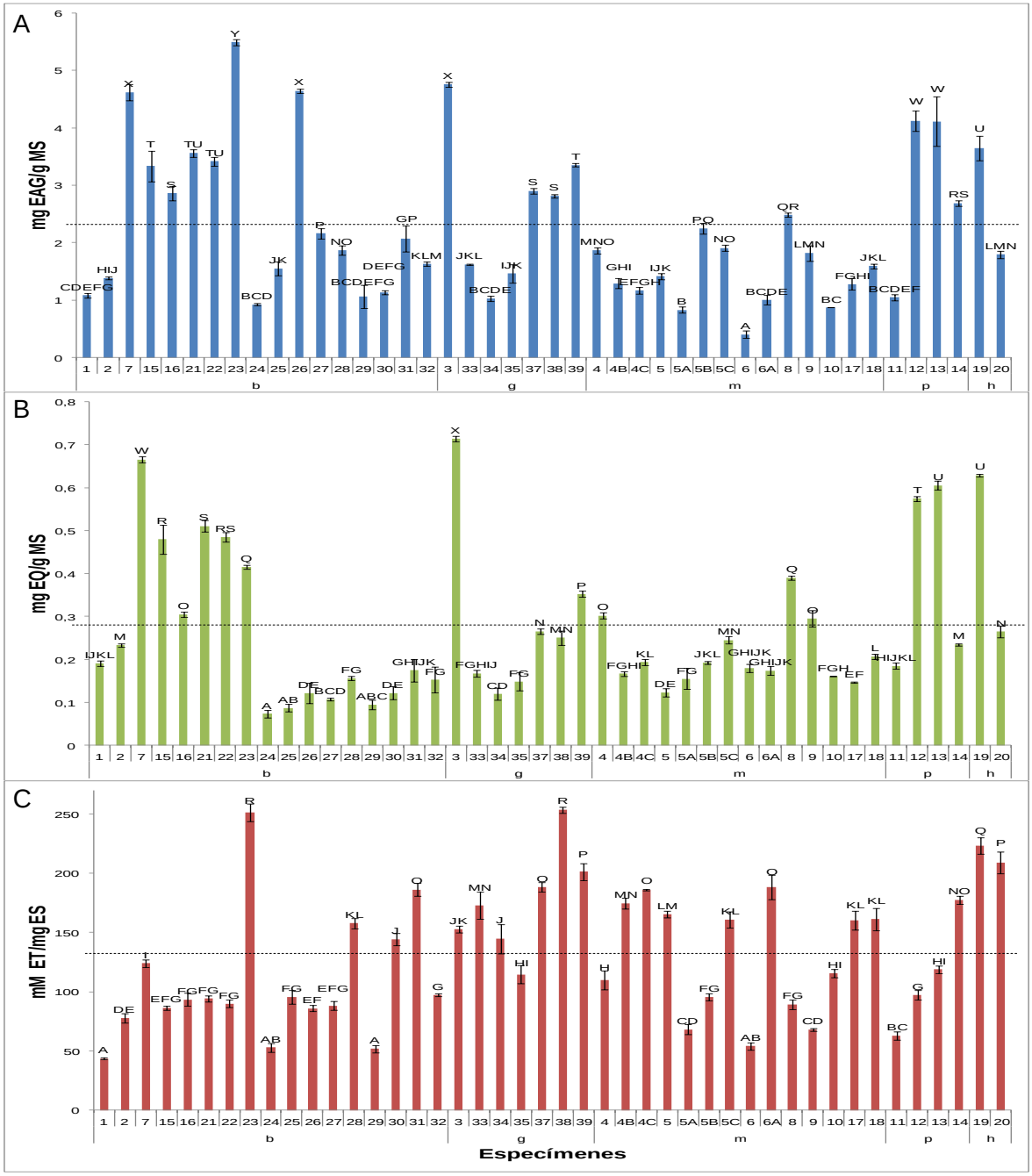


Figura 2.3. Variabilidad química en tallos de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. La línea punteada indica la media para cada caso.

Específicamente, las muestras de la figura 2.3 se distribuyeron en 25 agrupaciones para los análisis de FL y CFT, mientras que para CCRL fueron 19, indicando con ello ser menos variable que CFT. En la figura 2.3 correspondiente a los resultados de tallos se destaca la muestra **23**, perteneciente a la especie *L. bogotensis* al presentar valores altos en CFT (8,64 ± 0,20mg EAG/g MS); mientras que la muestra **7** fue la de mayor FL con 0,67 ± 0,01 mg EQ/g MS en esta especie. En la muestra **3** (*L. guascensis*) se evidenció el mayor valor para el CFT con 4,76 ± 0,04 mg EAG/g MS; en cuanto a los flavonoides este mismo espécimen presentó el mayor contenido entre todas las muestras, siendo 0,71 ± 0,01 mg EQ/g MS y respecto a la CCRL la muestra **3** tuvo un valor que superó la media general de tallos (130,22 mM ET/mg ES); la muestra con mayor resultado en la figura 2.3.C fue la **38** con 253,58 ± 2,42 mM ET/mg ES.

En la especie *L. mirabilis* el mayor contenido tanto de fenoles como de flavonoides lo presentó la muestra **8** (2,48 ± 0,03 mg EAG/g MS y 0,39 ±0,00 mg de EQ/g MS, respectivamente); por su parte, las muestras **4B** y **6A** fueron las de mayor capacidad antioxidante. No se evidenció patrón alguno en las muestras de un mismo espécimen colectadas en diferentes épocas del año para el CFT, pero si la formación de tres grupos según el test de Tukey, cada uno de ellos considerado estadísticamente similar, el primero de ellos lo integraron las muestras **4** y **5C**; el segundo por **4B** y **17**; por último el grupo **5A** y **10**, cuyos especímenes fueron colectaron el mismo día y se hallaban cercanos a la carretera. De acuerdo al FL se concentraron las muestras formando cuatro agrupaciones, siendo estas: **4** y **9**; **4B**, **5A** y **10**; **4C** y **5**, por último **6** y **6A**; las muestras mencionadas anteriormente tienen en común la zona de colecta. En *L. mirabilis* los valores más bajos fueron por parte del espécimen **6** con 0,40 ± 0,06 EAG/g MS y 53,97 ± 3,06 mM ET/mg ES, para CFT y CCRL, respectivamente.

Las muestras de la especie *L. pubescens* se destacan por un elevado CFT, salvo el espécimen **11**, el cual tuvo un valor de tan solo 1,05 ± 0,05 mg EAG/g MS; de igual manera se presentó en **11** el menor valor tanto para FL como en CCRL (0,19 ± 0,01 mg EQ/g MS y 62,78 ± 3,33 mM ET/mg ES, respectivamente).

La capacidad captadora de radicales libres de la especie *L. humifusus* fue una de las más elevadas entre todas las especies respecto a la media (CCRL $\bar{x}_t$=130,22 mM ET/mg ES). En la muestra **19** fue evidente un valor elevado en la cuantificación de fenoles, flavonoides y capacidad de captura de radicales libres, mientras que el espécimen **20** pese a expresar una alta

capacidad antioxidante, apenas superó la media para fenoles y flavonoides. Según Quiñones (2013) esto se debe a que aunque los niveles de compuestos fenólicos en un tejido sean superiores a otros, todos los compuestos fenólicos no poseen igual actividad antioxidante, por lo que la actividad de estos en el extracto debe estar relacionada directamente con el tipo de compuesto fenólico, también su actividad en la planta y no con la cantidad de estos.

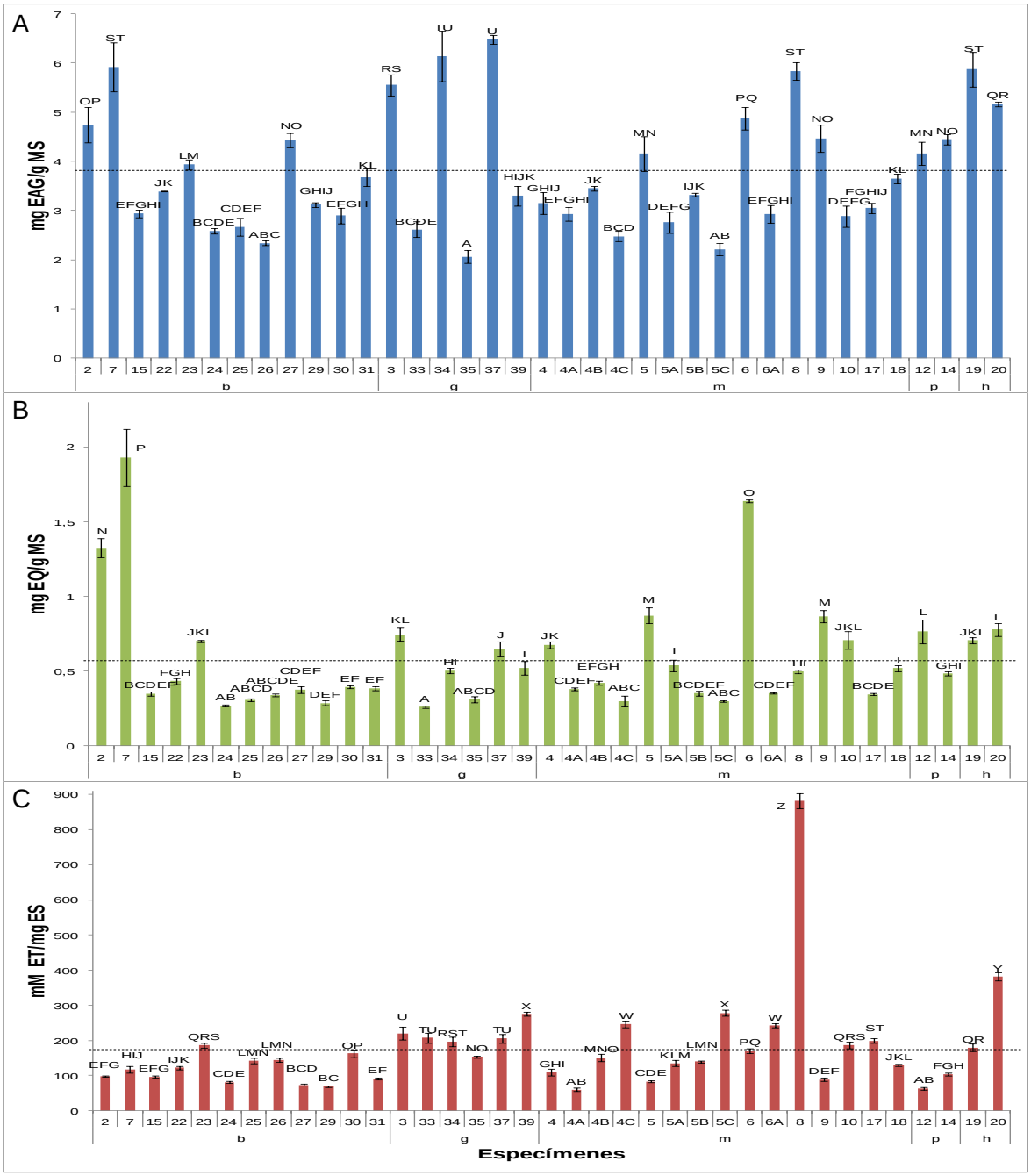


Figura 2.4. Variabilidad química en flores de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. La línea punteada indica la media para cada caso.

La figura 2.4 presenta los resultados para CFT, FL y CCRL de las flores de los especímenes estudiados. Se resalta en este órgano de forma general un alto CFT y FL respecto a tallos, vainas y semillas (Tabla 2.4-Anexo). Entre las cinco especies la muestra **37** (*L. guascensis*) fue la de mayor CFT con 6,48 ± 0,09 mg EAG/g MS; entre tanto, la **35**, perteneciente a la misma especie, mostró el menor contenido (2,06 ± 0,14 mg EAG/g MS); de otro lado, la muestra **7** (*L. bogotensis*) presentó el mayor valor para FL con 1,93 ± 0,19 mg EQ/g MS , mientras que **33** (*L. guascensis*), con 0,26 ± 0,01 EQ/g MS, resultó ser la de contenido más bajo de FL; en cuanto al potencial para captar radicales libres, la de menor capacidad fue la muestra **4A** con 59,91 ± 5,03 mM ET/mg ES, frente a 882,27 ± 21,05 mM ET/mg ES para la muestra **8**, siendo esta la de mayor capacidad.

Como resultado del test de Tukey se encontraron 22 grupos de muestras según el CFT, **18** de acuerdo con el FL y **25** por su respuesta frente al radical DPPH•. Este test en flores respecto a hojas y tallos generó menos agrupaciones, es decir sus valores tienden a ser más homogéneos estadísticamente. Por su parte, en la especie *L. guascensis*, sólo las muestras **33** y **37** mostraron valores estadísticamente similares para la capacidad antioxidante. Para el FL se formaron tres grupos dentro de las muestras de *L. mirabilis* con la coincidencia de la zona de colecta, estos fueron: **4**, **10** y **17**, el formado por **4A**, **5B** y **6A**, y por último, **4C** y **5C**; el análisis de CFT por su parte, formó solamente dos grupos: **4A**, **10** y **5A** como primer agrupación y **4** con **17**; estas muestras tienen en común haber sido colectadas en Usme. Tanto en las muestras pertenecientes a la especie de *L. pubescens* como de *L. humifusus* no se presentaron agrupaciones, indicando una marcada variabilidad, a pesar de ser colectadas en la misma época y en la misma zona; el metabolismo de estos especímenes resultó diferente, ya sea por factores ambientales o genéticos, pero no se pueden establecer conclusiones claras al tratarse de tan solo dos muestras por cada especie.

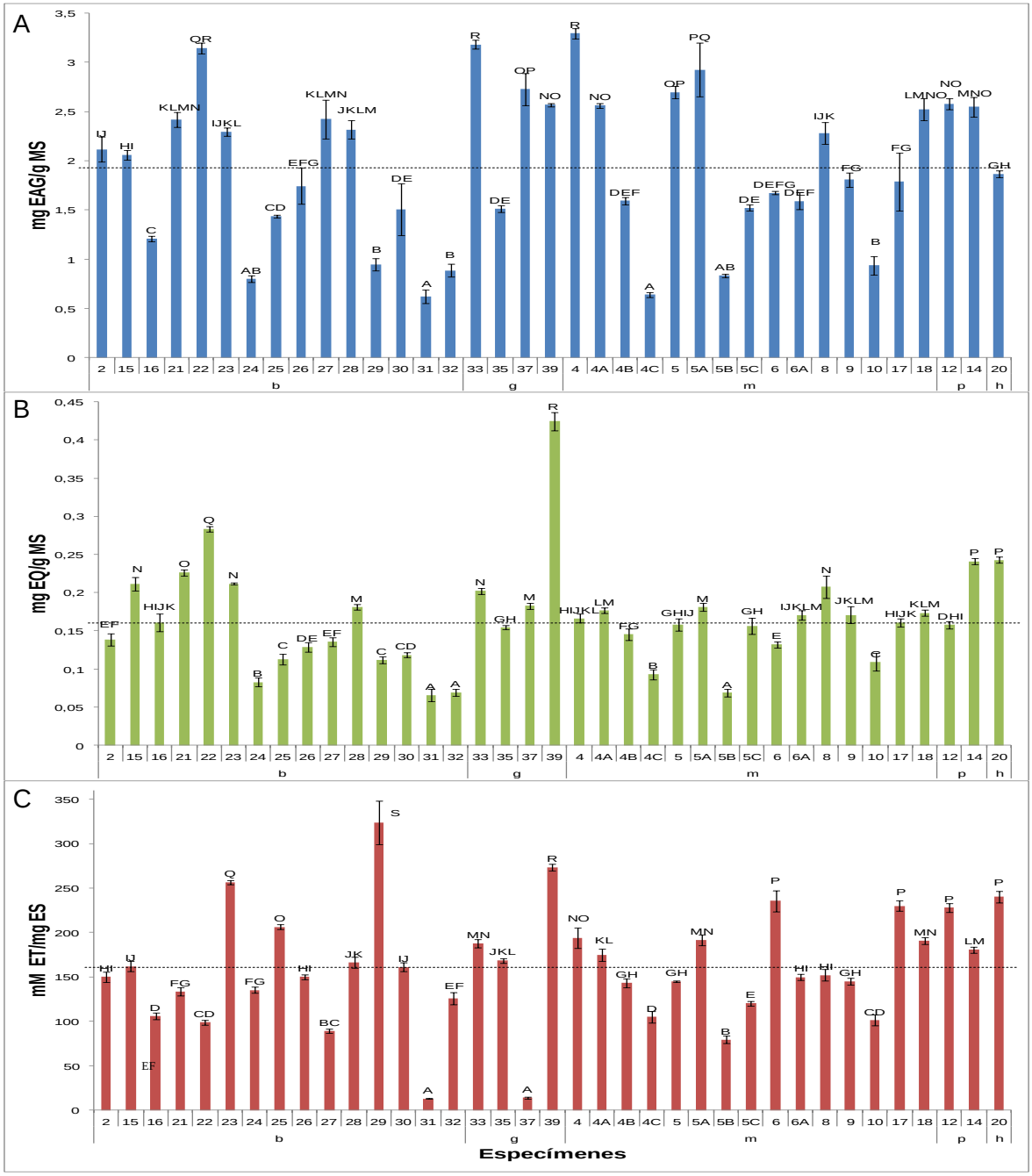


Figura 2.5. Variabilidad química en vainas de cinco especies del género *Lupinus.* A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Contenido de flavonoides (FL). C. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Media ± intervalo de confianza. Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. La línea punteada indica la media para cada caso.

En la figura 2.5 se observa en las vainas de *L. bogotensis* la tendencia a presentar un CFT por encima de la media general (1,91 mg EAG/g MS) de toda la población de muestras para ese análisis; sin embargo, CCRL no muestra la misma tendencia puesto que sus valores se hallan por debajo de la media general (159,82 Mm ET/mg ES), con excepción de la muestra **29**. La muestra **37**, perteneciente a la especie *L. guascensis*, presenta por su parte, uno de los menores valores de capacidad antioxidante con 4,08±1,15 mM ET/mg ES, en comparación con el promedio obtenido con todas las muestras de vainas para esta variable, pese a tener un alto CFT (2,73±0,16 mg EAG/g MS), así como un valor alto de FL (0,18±0,00 mg EQ/g MS). Indicando con ello que para esta muestra, la capacidad antioxidante no se encuentra directamente relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos. Particularmente, la capacidad antioxidante de las vainas del espécimen **4** presentó una conducta inversa con relación a la de flores, ya que a través de sus diferentes colectas la concentración equivalente a Trolox por miligramo de extracto seco disminuyó.

Por su parte, la única muestra de *L. humifusus* (**20**), se caracteriza por presentar uno de los valores más altos para vainas en equivalentes a Trolox (240,30±6,52 mM/mg ES), así como en el CFT (1,87±0,03 mg EAG/g MS). En *L. bogotensis* no se observa una relación entre las variables, sus concentraciones fluctúan sin ningún patrón apreciable. La muestra **4** presenta el valor más alto de CFT con 3,30 ± 0,05 mg EAG/g MS, este mismo comportamiento se repite en flavonoides cuyo contenido se encuentra entre los más altos de la medida, 0,17 ±0,01 mg EQ/g MS y una capacidad antioxidante relativamente alta de 193,93 ±11,20 mM ET/mg ES, lo que podría indicar que, en contraste con *L. guascensis*, para *L. mirabilis* aquellas sustancias que operan como antioxidantes y dan esta alta capacidad son los fenoles. Aditivo, la menor CFT la mostró el espécimen **31** con 0,62 ± 0,07 mg EAG/g MS y un FL de 0,07 ± 0,01 mg EQ/g MS, valor que se encuentra entre las menores concentraciones obtenidas; en cuanto al método de DPPH, la muestra **31** presentó la menor concentración siendo 12,81±0,28 mM ET/mg ES. Estos resultados indican que para este espécimen, al igual que para la muestra **4**, aquellos compuestos con característica antioxidante son de naturaleza fenólica.

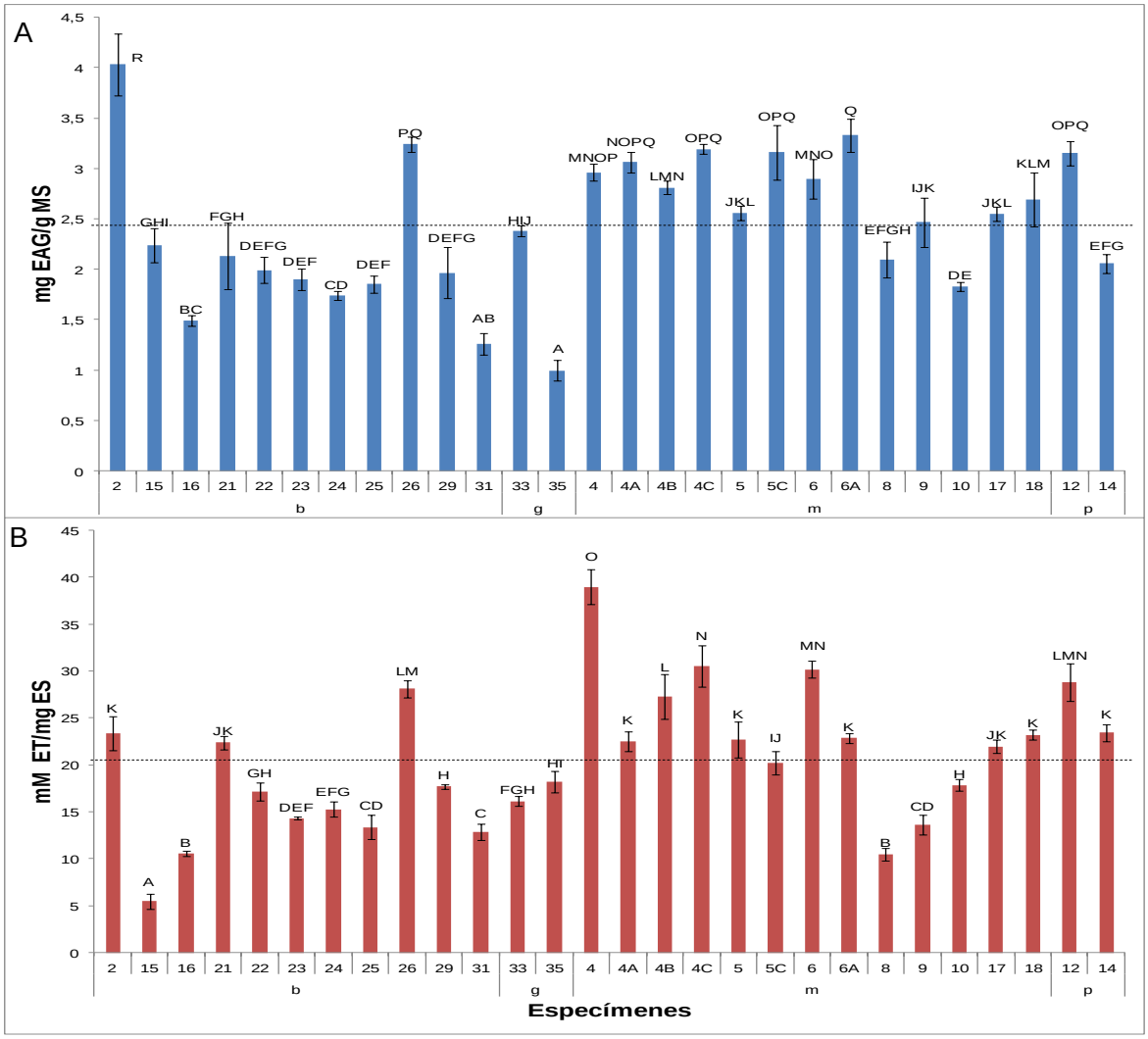


Figura 2.6. Variabilidad química en semillas de cinco especies del género *Lupinus.* Media ± intervalo de confianza. A. Contenido de fenoles totales (CFT). B. Capacidad captadora de radicales libres (CCRL). Letras diferentes indican las diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey. La línea punteada indica la media para cada caso.

La figura 2.6 presenta los resultados obtenidos para la cuantificación de fenoles totales y capacidad captadora de radicales libres en semillas. Cabe notar que las soluciones etanólicas de semillas no presentaron reactividad frente al $AlCl_3$, o al menos esta no fue detectable bajo las condiciones del método (absorbancias por debajo del límite de cuantificación incluso con solución de extracto sin diluir); por tanto, fue imposible determinar el contenido de flavonoides en semillas. A pesar de no presentar valores significativos para la cuantificación de flavonoides

totales, las muestras de semillas exhibieron valores de capacidad antioxidante, que si bien fueron bajos, pueden ser un indicativo de la presencia de otro tipo de compuestos que contribuyen al desarrollo de esta propiedad. Las muestras de *L. mirabilis* tienen en general los valores más altos para las dos variables; en el caso de capacidad captadora de radicales libres, la muestra **8** presenta el menor resultado con 10,49 ± 0,67 mM ET/mg ES y **4** el más elevado con 38,96 ± 1,86mM ET/mg ES. Los datos anteriores obtenidos por algunos representantes de la especie *L. mirabilis* siguen distando significativamente entre ellos, es decir, hay diferencias entre los valores presentados en al menos una muestra de la especie.

En términos de capacidad captadora de radicales, las semillas de *L. pubescens* presentan concentraciones que sobrepasan la media general para todas las muestras de semillas (20,05 Mm ET/mg), siendo 28,83 ± 1,97 mM ET/mg ES para la muestra **12** y **23**, 45 ± 0,91 ET/mg ES para la **14**. La especie *L. bogotensis*, presentó en general resultados con valores menores en comparación con *L. mirabilis*; por ejemplo, para la muestra **31** el CFT fue 1,26 ± 0,11 mg EAG/g MS, uno de los valores más bajos en todas las muestras de semillas; sin embargo, *L. bogotensis* también presentó valores por encima de la media en semillas (2,43 mg EAG/g MS), como es el caso de **26** con 3,24 ± 0,08 EAG/g MS; de otro lado, la medida de CCRL tiene como límite inferior el resultado de la muestra **15** con valor de 5,47 ± 0,81 mM TE/mg ES y el superior de 28,10 ± 0,86 mM TE/mg ES para la muestra **26**.

Previas investigaciones sobre la composición química de especies de *Lupinus* han mostrado, altos contenidos de fenoles. Wang y Clements (2008) reportaron para los fenoles totales presentes en las semillas de las especies *L. albus, L. angostifolius, L. atlantieus, L. consentinii, L. digitatus, L. luteus* y *L. mutabilis* 8,52, 5,61, 6,61, 7,06, 8,45, 3,72 y 7,99 mg EAG/g MS, respectivamente. En general, tales resultados son mayores comparados con los obtenidos en las especies de lupino estudiadas en el presente trabajo, salvo los reportados para *L. luteus* que corresponden a un valor cercano (tabla-2.3-Anexo). No obstante, es importante resaltar la diferencia en el método de extracción utilizado en ambas investigaciones, puesto que éste influye directamente en la cantidad de compuestos obtenidos, y por tanto, cuantificados; Wang y

Clements llevaron a cabo una extracción por maceración durante una noche con metanol al 80%, mientras que en el presente trabajo se usó etanol, ultrasonido y períodos cortos de extracción. Por otro lado, las muestras fueron colectadas en Australia, de tal manera que la diferencia en método y ubicación geográfica no permite concluir puntualmente acerca de las diferencias entre los valores reportados y los encontrados en el presente estudio.

Por otra parte, Siger y colaboradores (2012) estudiaron tres especies de lupino cada una en dos variedades diferentes, encontrando los siguientes valores para la capacidad captadora de radicales libres: 3,51 ± 0,20 y 6,78 ± 0,28 mM ET/mg ES en *L. albus*, variedades Butan y Boros, respectivamente; 9,03 ± 0,33 y 8,12 ± 0,10 mM ET/mg ES en la especie *L. luteus*, variedades Lord y Parys, respectivamente; y 6,89 ± 0,35 y 7,47 ± 0,29 mM ET/mg ES, para *L. angustifolius* Bojar y Zeus, respectivamente. Estos valores son menores a los determinados en el presente trabajo, que están en el rango entre 10 y 40 mM ET/mg de ES en las 5 especies; sólo la muestra **15** de *L. amandus* (5,47 ± 0,81 mM ET/mg de ES) mostró un resultado cercano a los valores reportados por Siger y colaboradores. Cabe señalar, que los datos obtenido en el artículo en mención, se obtuvieron después de un tratamiento muy diferente de la muestra; allí se reporta que las muestras fueron secadas a 105°C y su extracción fue realizada por método Soxhlet con *n*-hexano, y posteriormente para extraer compuestos fenólicos, se realizó adición de metanol al 80% por 30 min a una temperatura de 50°C. La cuantificación de fenoles se realizó a través del método de Folin-Ciocalteu, permitiendo un tiempo de reacción de una hora y midiendo a una longitud de onda de 725nm.

2.3.2. Correlación entre variables cuantitativas

En el presente estudio se empleó la correlación de Pearson, ya que su finalidad en el tratamiento de los datos obtenidos es establecer una correlación lineal entre las variables cuantitativas de estudio; las demás correlaciones a diferencia de esta, toman variables cuya distribución no es normal (Tau-β- de Kendall) o no establecen relaciones lineales sino monótonas, es decir que las variables cambian a un mismo tiempo pero no de manera constante (*rho* de Sperman) (Rodríguez, Álvarez y Bravo, 2001).

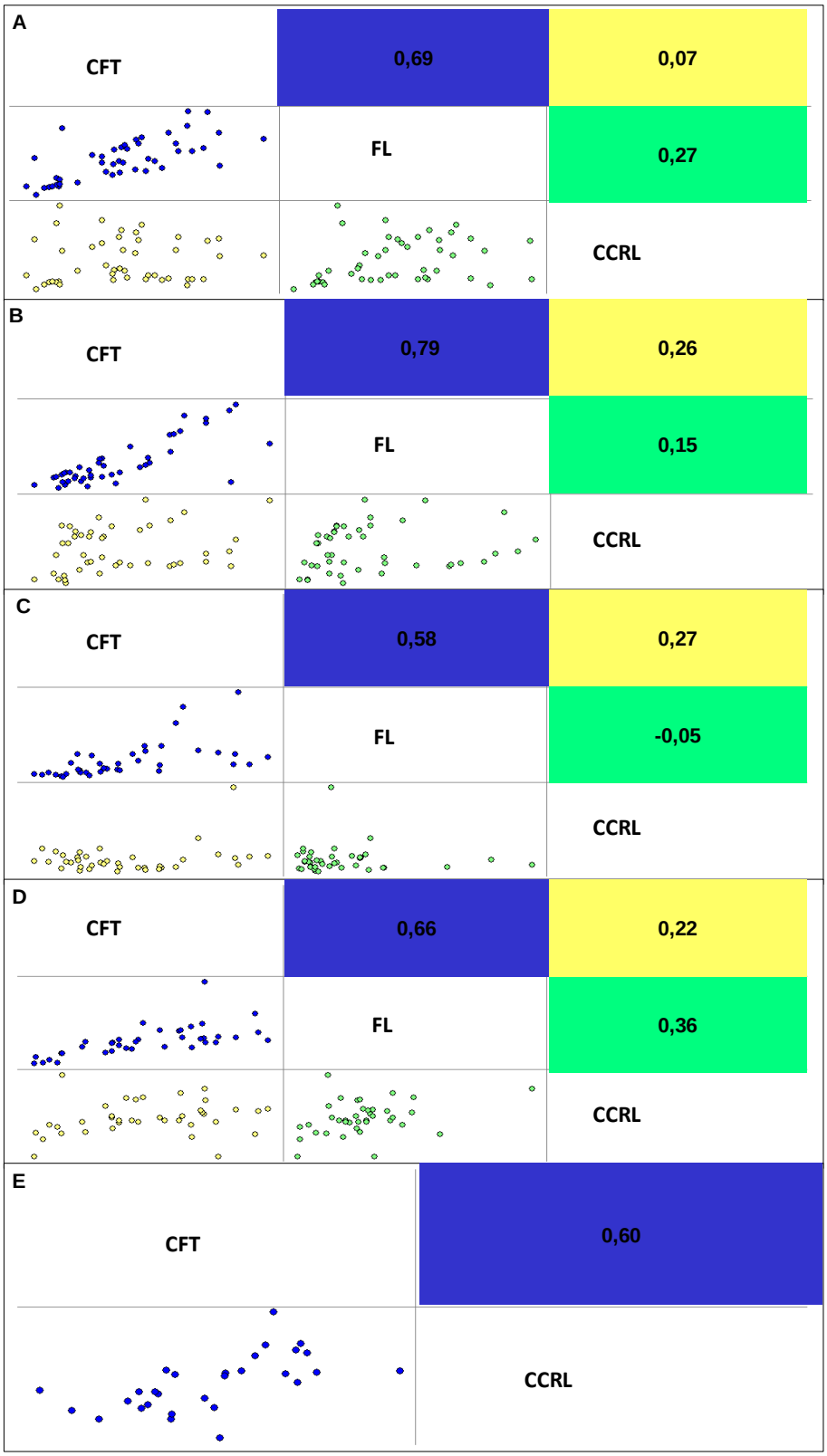

A
CFT
0,69
0,07
FL
0,27
CCRL
B
CFT
0,79
0,26
FL
0,15
CCRL
C
CFT
0,58
0,27
FL
-0,05
CCRL
D
CFT
0,66
0,22
FL
0,36
CCRL
E
CFT
0,60
CCRL

Figura 2.7. Correlación de Pearson entre los datos de CFT, FL Y CCRL en cinco especies del género *Lupinus*. A) Hojas. B) Tallos. C) Flores. D) Vainas. E) Semillas.

Para la interpretación del coeficiente de correlación de Pearson se deben tener en cuenta los siguientes rangos: 0.90 a 1.00 (-0.90 a -1.00) es una correlación muy alta, 0.70 a 0.90 (-0.70 a -0.90) es correlación alta, de 0.50 a 0.70 (-0.50 a -0.70) corresponde a una correlación moderada, 0.30 a 0.50 (-0.30 a -0.50) es una baja correlación y de 0.00 a 0.30 (-0.00 a -0.30) se considera una correlación insignificante (Mukaka, 2012).

Se observa en la figura 2.7 que para hojas, tallos, flores y vainas existe correlación positiva entre CFT y FL, lo que evidencia una asociación relativamente fuerte entre ambas variables, tal como ha sido previamente descrito (Beltrán, 2013); tales resultados sugieren que el FL contribuye con el CFT lo que concuerda con la naturaleza polifenólica de los flavonoides.

Para el caso de semillas, la capacidad de captar radicales libres medida por el ensayo de DPPH presentó correlación positiva con el CFT. Este resultado indica que hay compuestos fenólicos que pueden estar involucrados con la capacidad captadora en los extractos de este órgano de la planta. Entre estos pueden encontrarse las isoflavonas, un tipo de flavonoides ampliamente descrito en especies de *Lupinus* (Dettenborn, 2009), conocidas por presentar propiedades antioxidantes (Arias, 2015), dichos compuestos no se pueden identificar con el método de $AlCl_3$, ya que sólo las flavonas y flavonoles forman complejos estables con este reactivo (Salinas, 2012).

Ahora, por el contrario, las demás partes no presentan correlación entre CCRL con el CFT y FL. El CFT y FL al no presentar correlación con la capacidad antioxidante, demuestra que estos compuestos no tienen un papel predominante en la CCRL de hojas, tallos, flores y vainas, en concordancia con lo descrito por Abidi (2014). Entonces, a medida que aumenta la concentración

de flavonoides o de fenoles totales, no necesariamente va a incrementarse la capacidad captadora de radicales, en decir, no se relacionan con la capacidad de capturar el radical libre DPPH•.

2.4. CONCLUSIONES

Se halló que la cuantificación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante del género *Lupinus* presenta una amplia variabilidad. A pesar de trabajar con muestras de una misma especie en una población que abarcó 5 especies, se observó que variaron tanto en cuantificación como capacidad de captura de radicales libres, ya que pocos grupos fueron obtenidos conformados por más de dos muestras y que en ellos hubiese una relación más que pertenecer a la misma especie, por ejemplo fecha y lugar de colecta fue escaso. Las partes de la planta mostraron diferencias entre ellas, especímenes y especie, lo cual indica que el lugar de colecta interviene en la expresión de metabolitos; los diversos metabolitos secundarios que se acumulan en diferentes especies de esta familia, ya sea constitutivamente o en respuesta a un ataque, también pueden encontrarse bajo control genético y es dependiente de las condiciones ambientales (Alcantar, 2005).

Además, se estimó el hecho que los fenoles y flavonoides presentes poseen diferente comportamiento en la capacidad antioxidante, pues contienen compuestos que están más o menos relacionados según sea el caso con la capacidad de capturar radicales libres, ya que como reportó Quiñones (2013) todos los compuestos fenólicos no poseen igual actividad antioxidante. También, se encontró que los extractos provenientes de las hojas presentaron mayor CFT, FL y capacidad antioxidante; esto, concuerda con Torres y colaboradores (2005) quiénes describen que los fenoles y flavonoides se acumulan en las vacuolas y por ende aumenta su concentración en la epidermis de las hojas.

Las plantas de *L. mirabilis* (**4**, **5**, **6** y **10**) colectadas a pocos metros entre ellas y con varias accesiones del mismo especímen en distintas épocas del año presentaron características químicas variadas; esto se justifica con base en que cada planta debe enfrentar diferentes situaciones, defenderse de los posibles depredadores, sobrevivir a factores ambientales tales como la

radiación UV, estado fenológico, órgano de la planta, temperatura, factores bióticos y abióticos en general (Anaya, 2003) que favorecen los cambios químicos.

2.5. REFERENCIAS

- Abidi, W. (2012). Evaluation of agronomical and biochemical traits and mapping QTLs controlling fruit quality traits in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] progenies. (Tesis doctoral). Zaragoza: Universidad de Zaragoza. (p. 5)
- Alcántar, F. (2005). Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). (Tesis de Maestria). México: Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional.
- Aranceta, J., Pérez, C. (2006). *Frutas, ortalizas y verduras.* Ortega, R., Basabe, B., y López, A. Frutas, verduras y salud. (pp. 1-17). Barcelona: Masson.
- Arias, C. (2015). Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet) una planta con potencial nutritivo y medicinal. *Revista Bio Ciencias*, 3(3), 163-172.
- Anaya, A. (2003). Ecología química (p. 29). México: Plaza y Valdes S.A.
- Barrera, V., Tapia, C., Monteros, A. (2004). Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador (p.113). Ecuador: International Potato Center.
- Beltrán, Y., Morris, H., De la Cruz, E., Quevedo, Y., Bermúdez, R. (2013). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(*2*),121-129.
- Bors, W y Saran, M. (1987). *Radical scavenging by flavonoid antioxidants*, *2(*4-6), 289-294.
- Céspedes, C y Salazar, J. (2006). Los flavonoides en el instituto de química, una relación histórica. A Romo de Vivar Romo (Eds.), *Química de la flora Mexicana*. (1ra Ed., pp. 63- 88). México: UNAM.
- Cortés, A. (2004). Suelos colombianos: una mirada desde la academia. (pp. 169-170). Colombia: Universidad Jorge Tadeo Lozano.

- Dettenborn, D. (2009). Investigación de isoflavonas en especies de leguminosas nativas del dur de Brasil, con énfasis en *Trifolium riograndense* Burkart. (Tesis de maestria). Porto alegre: Universidad federal de Rio Grande del Sur. (p. 15).

- Guemes, N., Martínez, J., Hernandez, J., Yanez, J., & Totosaus, A. (2012). Comparison of Chemical Composition and Protein Digestibility, Carotenoids, Tanins and Alkaloids Content of Wild Lupinus Varieties Flour. *Pakistan Journal of Nutrition, 11*(8), 676-682.
- Guerrero, J. (2011). Química Orgánica. (p.11). Ecuador: Universidad Central Del Ecuador.
- Harborne, J. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry.* (p. 269). California, USA: Elsevier Ltd.
- Iglesias, J. (2009). *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*, (pp. 69-70), España: Universidad Santiago de Compostela.
- Ingham, A., Tahara, S., y Harborne, J. (1983). Fungitoxic Isoflavones from Lupinus albus and other Lupinus Species. *Z. Naturforsch, 19,* 194-200.
- Malešev, D., y Kunti, V. (2007). Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc,* 72(*10*), 921–939.
- Moncada, J. (2005). Estadística Para Ciencias Del Movimiento Humano. (p. 32). Costa Rica: Universidad de costa Rica.
- Mukaka, M. (2012). A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med Journal,* 24(*3*): 69–71.

- Muñoz, O., Montes, M., Wilkomirsky, T. (2001) Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. (p.15). Chile: Editorial Universitaria.
- O'Gorman, D. (2003). A tu salud: los sorprendentes efectos preventivos y terapéuticos del vino. (pp. 101-107). España: Editorial Sirio, S.A.
- Osuna, L., Tapia, M., y Aguilar A. (2005) Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. (p. 103). Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
- Porras, A., y López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos,* 3(*1*). 121-134.

- Salinas, R. (2012). Estudio Comparativo De La Actividad Antioxidante Y De La Composición En Compuestos Fenólicos De Propóleos De La Región Metropolitana De Santiago, Chile. (Tesis). Chile: Universidad De Chile. (p. 29).
- Quiñones, M., Miguel, M y Aleixandre, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(*1*), 76-89.
- Quiñones, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y., Hernández de la Torre, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Rev Cubana Plant Med*, 18(*2*), 201-215.
- Ramos, E., Castañeda, B., & Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Peru Salud, 15* (1), 42-46.
- Rodríguez, M., Álvarez, S y Bravo, E. (2001). Coeficientes de Asociación. (p. 56). México: Plaza y Valdes. S.A.
- Sepulveda, G., Porta, H y Rocha M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. (pp 355 – 363). Revista Mexicana de fitopatología, diciembre, volumen 21, número 033, Ciudad de Obregón México, México.
- Siger, A., Czubinski, J., & Kachlicki, P. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species, *Journal of food composition and analysis, 25*, 190-197.
- Suarez, C., Rengifo, B., Martí, A y Cárdenas, V. (2002). Colombia Andina (p. 82). Bogotá, Colombia: Editorial Norma.
- Taxonomía del *Lupinus bogotesis.* Consultado: [24/04/16] Disponible en: http://www.iucnredlist.org/details/19891959/0.
- Torres, L., Tapia, M., Aguilar, a. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. (pp 63-63). Edicions Universitat Barcelona: Barcelona.
- Vázquez, C., De Cos Blanco, A y López, C. (2005). Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico. (p. 115). España: Ediciones Díaz de Santos.
- Wang, S y Clements, J. (2008). Antioxidant Activities Of Lupin Seeds. *The 12th International Lupin Conference,* Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture, The University of Western Australia 546-551.

CAPÍTULO 3:

Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM).

3.1. INTRODUCCIÓN

La palabra cromatografía, formada a partir de las raíces griegas *khroma* (color), *graphein* (grabar, escribir), más el sufijo *ia* (acción, cualidad), es descrita por Silva (2006), como "el método de separación en el que los componentes a desglosar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario y la otra es un fluido que pasa a través a lo largo de un lecho estacionario". La cromatografía líquida (CL) fue descubierta en 1903 por el botánico ruso M. S. Tswett (Harris, 2006), que a partir de la experimentación con pigmentos vegetales dispuestos en una columna de vidrio cargada con carbonato de calcio ($CaCO_3$) y empleando éter como eluyente, observó la separación del pigmento en distintas bandas coloridas que descendían de la columna a diferentes velocidades (Técnicas cromatográficas, 2007) y de allí proviene su denominación (Atkins y Jones, 2006). La cromatografía es una de las herramientas más poderosas usadas para separar mezclas, ya que corresponde a un medio económico que arroja información tanto cuantitativa como cualitativa (Atkins y Jones, 2006). Una de las más significativas mejoras condujo al desarrollo de la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), la cual permite la separación y determinación de especies químicas presentes en diversos materiales, ya sean orgánicos o inorgánicos, incluyendo biológicos, en corto tiempo; la CL ofrece una separación más efectiva que otras técnicas cromatográficas, obteniéndose resultados con alta resolución, y por tanto, proporcionando mayor cantidad de información, lo cual aporta significativamente al desarrollo de una investigación; adicionalmente, existe alta

reproducibilidad de resultados gracias a su sistema automatizado. Esta técnica se clasifica según la fase estacionaria que emplee en: cromatografía de reparto, de absorción, de intercambio de iones, de exclusión molecular, de afinidad y cromatografía quirál, dependiendo del fenómeno que usa para lograr la separación de los compuestos (Skoog y otros, 2005).

Los avances en la química y en la tecnología han posibilitado el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, así como extendido el uso de las ya existentes. Algunas de estas se han combinado para extender la utilidad de los métodos componentes (Skoog y otros, 2005). Este es el caso de la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM), herramienta importante en la metabolómica (la cual pretende la determinación cuantitativa de aquellos compuestos involucrados en las diferentes rutas metabólicas de la planta) adaptándose a estudios metabolómicos dirigidos (búsqueda o cuantificación de metabolitos concretos) o no dirigidos (estudio del perfil metabólico de las muestras) (Aljama, 2009). Esta técnica emplea tanto la fase normal (FN) como las columnas de fase reversa (FR) tales como C-8 y C-18, siendo también las más utilizadas en metabolómica, esta ultima de tipo convencional con tamaños de partícula de 3-5 micras (Broeckling y otros, 2005).

El uso extendido de estas técnicas ha permitido el desarrollo de importantes investigaciones en distintas áreas, pudiéndose encontrar valiosos ejemplos de trabajos relacionados con el campo de la fitoquímica. Entre estos se pueden mencionar, el estudio realizado por Barrón y otros (2011), ellos evaluaron el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en hojas de *Cadia secundiflora*, seguido de un análisis por CLAE-EM donde se identificaron flavonoides como quercetina, isoramnetina y kaemferol. También Papp y colaboradores (2004) empleando la técnica CLAE-DAD-EM, determinaron agliconas de flavonoles y flavonoles di-glucósido. Si bien estos enfoques no son suficientes para igualar por completo las mediciones analíticas dirigidas respecto a la capacidad para cuantificar con precisión analitos individuales, esta tarea la complementan los métodos de procesamiento de datos, quienes a partir de procedimientos matemáticos, posibilitan la realización de estudios comparativos de los analitos, aunque estos sean desconocidos (Van der Greef, 2003). Katajamaa (2005) mencionó varias etapas para el procesamiento de datos obtenidos a partir de CL-EM, estas son: etapa de filtrado espectral, cuyo objetivo es reducir la complejidad de los espectros y la eliminación del ruido. Detección de picos, encuentra los picos correspondientes a los compuestos o fragmentos de los

mismos. Alineación, tiene por objeto compensar los picos correspondientes en las diferentes ejecuciones de muestra. Y finalmente el papel de la normalización es reducir el error sistemático mediante el ajuste de las intensidades dentro de cada muestra de ejecución.

Tomando como punto de partida las investigaciones mencionadas anteriormente, se procedió con la investigación mediante CLAE y CLAE- ESI-EM junto con un sistema de elución por gradiente, para la caracterización de los perfiles metabólicos y posterior identificación tentativa de los compuestos presentes en los 47 especímenes de las 5 especies del género *Lupinus* analizadas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. General

El equipo usado para el perfilado CLAE-EM fue un cromatógrafo Shimadzu QP2020 que consta de un módulo de separación equipado con un detector de arreglo de diodos (Shimadzu SPDAD-M20A), una interface de ionización por electrospray (ESI) y un detector de masas Shimadzu LCMS2020 de cuadrupolo sencillo con un flujo de 0,7 mL/min. La separación se llevó a cabo en una columna Premier C-18 estándar (150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm). Las fases móviles utilizadas fueron ácido trifluoracetico (TFA) en agua de altísimo grado de pureza (grado CLAE), al 0.005% como fase A y acetonitrilo (ACN) como fase B, este último grado CLAE. El desarrollo experimental se realizó completamente en el Laboratorio de Química Bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada, sede Campus (km 2 vía Cajicá-Zipaquirá).

3.2.2. Perfilado por CLAE-DAD

Cada extracto obtenido mediante el procedimiento descrito en la sección 2.2.3 (capítulo 2) fue sometido a perfilado. Para ello cada muestra se filtró usando microfiltros de PTFE de 0.2 µm. El programa de elución fue optimizado previamente usando la muestra **H4** seleccionada aleatoriamente. El programa final utilizado consistió en elución por gradiente lineal de múltiples etapas con base en el porcentaje empleado de ACN, como se describe a continuación: 0 a 3 min (10%), 13 a 18 min (18%), 27 min (32%), 45 a 48 min (100%) y por último, 62 a 65 min (10%). El volumen de inyección fue de 20 µL. La separación se monitoreó a una longitud de onda de 270 nm, empleando para ello un detector de arreglo de diodos (DAD); para el desarrollo del

presente trabajo tan solo se empleó la información obtenida a 270 nm, (longitud de absorción máxima para compuestos fenólicos). Posteriormente los cromatogramas fueron procesados con el software MATLAB® 2013A para obtener datos alineados en la escala de tiempo, según el órgano de la planta, con el método COW (Correlation Optimized Warping) (Nielsen, 1998) seguido, los datos fueron normalizados y autoescalados a partir de cálculos matemáticos en la hoja de cálculo Microsoft Excel; cuyo objetivo es realizar una transformación de estos o reducir la influencia de altas variables inconsistentes, dentro de un conjunto de valores apropiados según el caso (Diaz, 2011). Finalmente, se empleó el software OriginPro 8.5 para construir los gráficos de intensidad de señal en función del tiempo de retención (cromatograma), facilitando así el análisis de datos y posterior generación de resultados.

3.2.3. Detección CLAE-DAD-EM

Teniendo en cuenta la resolución y cantidad de picos encontrados en los análisis de la sección anterior, se seleccionaron muestras representativas de cada especie, contando con los distintos órganos de la planta, para un total de 24 muestras, así: Hojas **4B**, **12**, **20**, **30** y **38**, tallos **2**, **3**, **4C**, **12** y **19**, Flores **2, 6A**, **14**, **19**, y **37**, vainas: **2**, **4A**, **12**, **20**, y **39**, y semillas: **2**, **6**, **14**, y **33**, de las especies *L. mirabilis*, *L. pubescens*, *L. humifusus*, *L. bogotensis* y *L. guascensis*, respectivamente. Dichas muestras fueron sometidas nuevamente al análisis cromatográfico empleando esta vez también la detección por el espectrómetro de masas bajo temperatura de calentamiento de 280ºC, de 100 a 200 umas y un flujo N2 de 9 a 1,4mL/min, usando ESI en modo positivo.

3.2.4. Análisis de espectros de masas

Se identificó tentativamente 28 compuestos presentes en las 24 muestras analizadas a partir de los resultados obtenidos por espectrometría de masas de todas las especies, teniendo en cuenta el pico de ion pseudo-molecular visualizado en los espectros de masas por ESI y comparado con la base de datos MassBank (Horai y otros, 2010) así como con lo reportado en la literatura respecto a los compuestos hallados en el género o la especie.

A través del análisis de los cromatogramas obtenidos por CLAE a 270 nm, de los compuestos detectados se seleccionaron 28, tomando como base una intensidad de señal apreciable y

resolución de los picos mostrados en los cromatogramas y/o presencia en una gran cantidad de muestras en los extractos etanólicos de los cinco órganos de cada una de las plantas colectadas.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Análisis de los espectros de masas

Inicialmente se realizó la selección de las muestras según el apartado 2.3 del presente capítulo, obteniendo así los espectros de masas para los picos detectados en cada uno de los 24 cromatogramas, a partir de los cuales se realizó la búsqueda en MassBank conjuntamente con lo reportado en literatura del género o la especie, identificando tentativamente 28 compuestos mayoritarios entre las muestras de *Lupinus.*

Tal como se presentó en el capítulo 1, algunas especies del género *Lupinus*, han reportado la presencia de alcaloides quinolizidínicos (Van W y k, 1995), sustancias tales como taninos, oligosacáridos, lecitinas, fitatos, saponinas (Guemes y otros, 2012), así como gran cantidad de flavonoides de tipo isoflavona (Ingham, 1983). Como producto de la identificación se obtuvo que la mayoría de los compuestos son flavonoides y un alcaloide (ácido (2S)-2-[[2-(1H-indol-3-il) acetil]amino]butanedioico). La asignación de tales compuestos, fue soportada por la presencia de los mismos en el género (*Lupinus)* o por lo menos en la familia (*Fabaceae*).

A continuación, en la figura 3.1, se presentan las estructuras químicas de los 28 compuestos hallados tentativamente.

N° de pico	TR (min)	Nombre	Fórmula molecular	m/z
1	6,00	2-[3,4-(metilendioxi)fenil]-4*H*-furo[2,3,h]1-benzopiran-4-ona	$C_{18}H_{10}O_5$	306,58
2	9,00	Quercetin-5´-*O*-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464,10
3	10,5	3,3',4',5,7-Pentahidroxi-8-metoxiflavona	$C_{16}H_{12}O_8$	334,15
4	11,40	5-Hidroxi-2-fenil-4*H*-furo[2,3-h]-1-benzopiran-4-ona	$C_{17}H_{10}O_4$	277,10

Tabla 3.1. Continuación.

N° de pico	TR (min)	Nombre	Fórmula molecular	m/z
5	15,23	2'-Hidroxigenistein-7-*O*-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,95
6	18,00	Genisteína	$C_{15}H_{10}O_5$	270,05
7	19,90	7,4'-Dihidroxiflavona 7-*O*- glucuronósido	$C_{21}H_{21}O_{10}$	433,05
8	23,00	Quercetin 3-gentiobiósido	$C_{27}H_{30}O_{17}$	626,05
9	24,50	Kaempferol 7-*O*-ramnopiranósido	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433,90
10	26,00	Genistein 8-*C*-(6"-malonilglucósido)	$C_{24}H_{22}O_{13}$	518,10
11	27,00	7,4'-Dihidroxiisoflavona 7-*C*-(6"-malonilglucósido)	$C_{24}H_{22}O_{12}$	502,25
12	28,00	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	286,05
13	28,40	2'-Hidroxigenisteína	$C_{15}H_{10}O_6$	286,05
14	31,90	Luteona *O*- diglucósido	$C_{32}H_{38}O_{16}$	678,16
15	32,20	2'-Hidroxi-5-metoxi-6,7-metilendioxiisoflavona	$C_{17}H_{12}O_6$	312,06
16	32,50	Luteona 7-*O*-(6''-malonilglucósido)	$C_{29}H_{24}O_{14}$	596,11
17	35,70	12α-Hidroxidolineona	$C_{19}H_{12}O_7$	352,06
18	36,50	Luteona	$C_{20}H_{18}O_6$	354,07

Tabla 3.1. Continuación

N° de pico	TR (min)	Nombre	Fórmula molecular	m/z
19	30,00	Wighteona	$C_{20}H_{18}O_5$	338,08
20	38,40	2'-Hidroxigenistein 4',7-*O*-diglucosido malonato	$C_{30}H_{32}O_1$	696,15
21	39,00	Eriodictiol diglucosido dimalonato	$C_{33}H_{36}O_{22}$	784,17
22	40,50	Acacetin 8-*C*-(6''-malonilglucósido)	$C_{25}H_{24}O_{13}$	532,29
23	14,90	Crisoeriol *O*-xilosilglucósido	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594,16
24	26,50	Crisoeriol *O*-glucósido	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,08
25	3,90	Ácido (2S)-2-[[2-(1H-indol-3-il) acetil]amino]butanedióico	$C_{14}H_{14}N_2O_5$	290,09
26	12,23	Miricetin 3-*O*-galactósido	$C_{21}H_{20}O_{13}$	480,09
27	49,01	Licoflavona B	$C_{25}H_{26}O_4$	390,18
28	53,53	Quercetin 3-glucurónido-7-rutinósido	$C_{33}H_{38}O_{22}$	786,19

Los compuestos identificados tentativamente de acuerdo al espectro de masas por ESI en modo positivo (Tabla 3.1) fueron marcados con un número consecutivo según su aparición de menor a mayor tiempo de retención en los cromatogramas de hojas; para aquellos compuestos que fueron identificados posteriormente en otros órganos, se usó el mismo criterio, continuando la numeración establecida a partir de hojas.

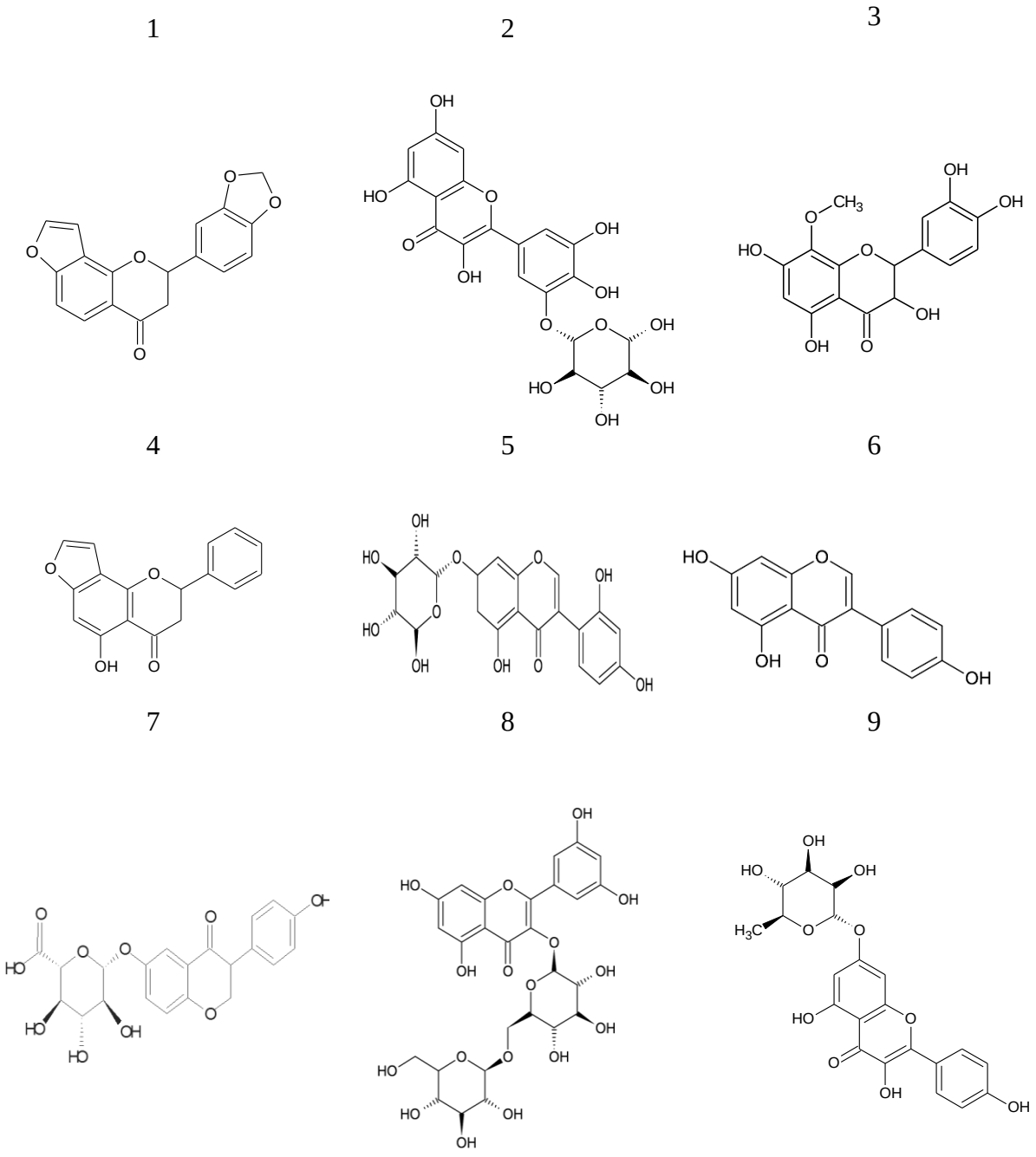
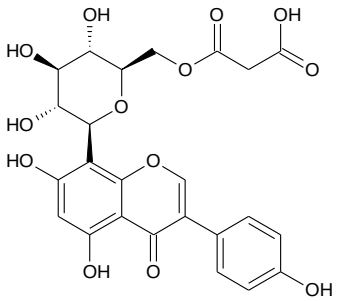
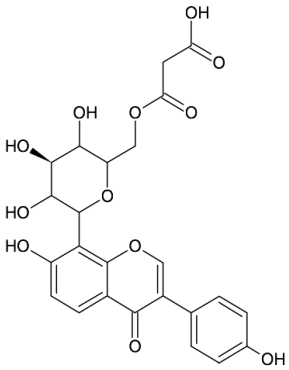


Figura 3.1. Estructuras químicas de compuestos hallados en extractos de *Lupinus*

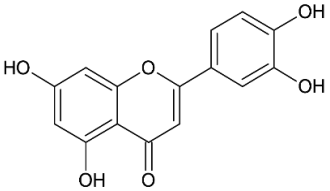
10



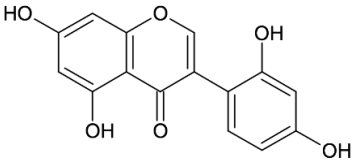
11



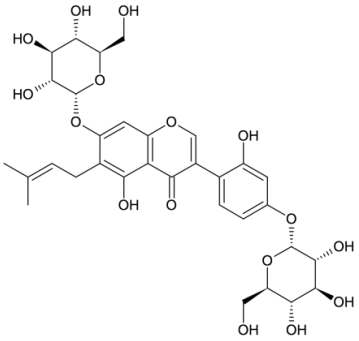
12



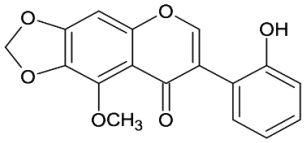
13



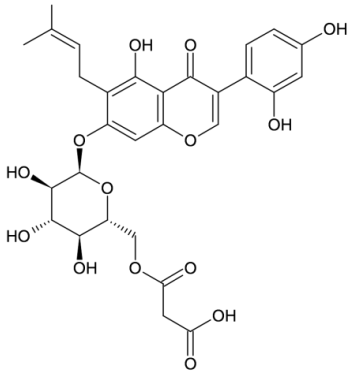
14



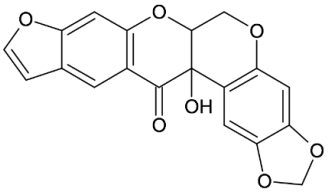
15



16



17



18

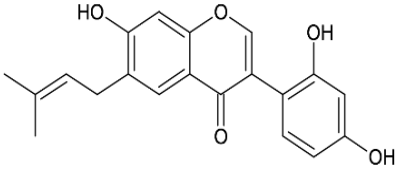
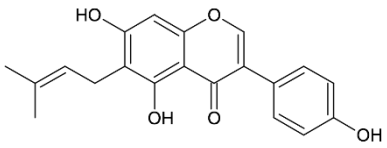
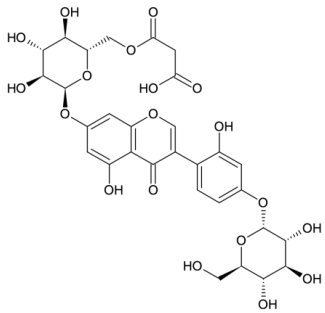


Figura 3.1. Continuación

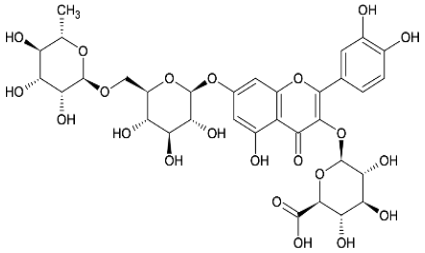
19



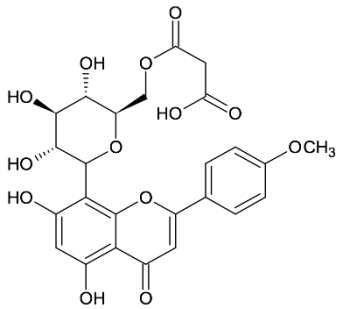
20



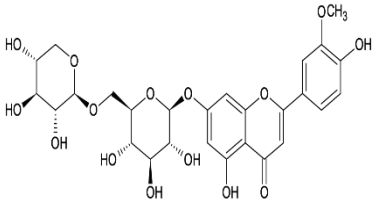
28



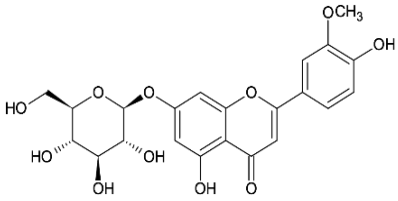
22



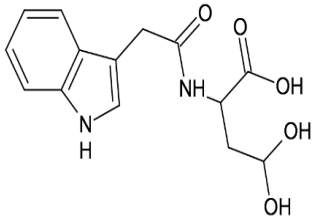
23



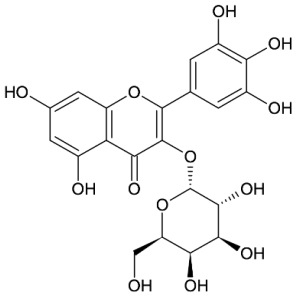
24



25



26



27

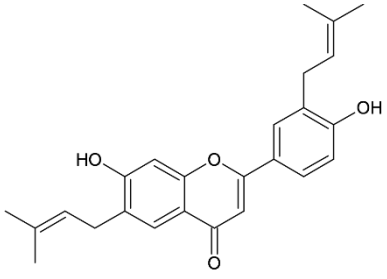


Figura 3.1. Continuación

21

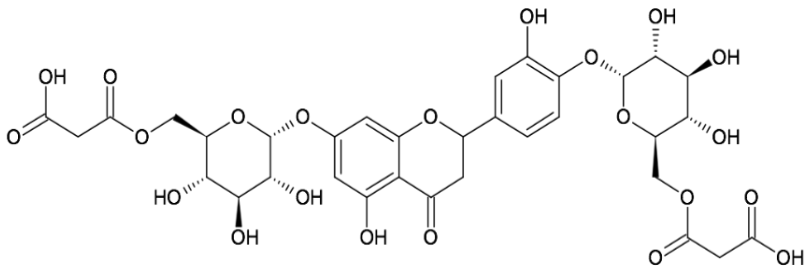


Figura 3.1. Continuación

Dentro de los compuestos identificados en el género *Lupinus*, diez y seis han sido reportados también en otros géneros tal como se evidencia en la tabla 3.2.

Tabla 3.1. Metabolitos secundarios reportados en otras especies de *Lupinus*

Pico	Fuente	Referencia
2	*L. mexicanus cerv*	Duke (1992)
5	*L. albus*	Schröder y Zähringer (1979)
6	*L. luteus*	Rucinska (2009)
10	*L. luteus*	Wojakowska (2013)
12	*L. arboreus, L. polyphyllus, L. sericeus*	Matthews (1993)
13	*L. angustifolius, L. albus, L. mexicanus*	Uribe (2015)
14	*L. angustifolius, L. albus*	Wojakowska (2013)
16	*L. elegans, L. exaltatus, L.hintonii, L.mexicanus, L. montanus, L. rotundiflorus, L.stipulatus, Lupinus sp*	Wojakowska (2013)
18	*L. albus, L. arboreus Sims, L. cruckshankii, L. densijlorus Benth, L. hartwegii Lindl, L. luteus, L. cv 'Sweet Yellow', L. micranthus Guss., L. mutabilis Sweet, L. nanus Dougl, L. polyphyllus Lindl, L. pubescens Benth., L. rivularis, L. subcarnosus*	Harboiw (1976)

Tabla 3.2. Continuación.

19	*L. elegans, L. exaltatus, L. hintonii, L. mexicanus, L. montanus, L. rotundiflorus,*	Piasecka (2012)

	L. stipulatus, L. albus, L. angustifolius, L. luteus, L. mutabilis	
20	*L. elegans, L. exaltatus, L.hintonii, L.mexicanus, L. montanus, L. rotundiflorus, L.stipulatus, Lupinus sp*	Wojakowska (2013)
21	*L.albus, L.angustifolius, L.luteus*	Wojakowska (2013)
22	*L. elegans, L. exaltatus, L.hintonii, L.mexicanus, L. montanus, L. rotundiflorus, L.stipulatus, Lupinus sp*	Wojakowska (2013)
23	*L.albus, L.angustifolius, L.luteus*	Yañez (2012)
24	*L.albus, L.angustifolius, L.luteus*	Yañez (2012)
25	*L. angustifolius*	Wojakowska (2013)

3.3.2. Análisis del perfilado por CLAE-UV

Con el fin de identificar la producción diferencial de metabolitos en el estudio de órganos de una misma especie, se realizó el análisis cromatográfico de los ejemplares **2** y **14** de *L. bogotensis* y *L. pubescens* respectivamente, al contar estas con los cinco órganos estudiados y permitir la comparación entre especies, siendo posible clarificar diferencias en cuanto a la presencia de algunos metabolitos, como los mencionados previamente, partiendo del hecho de encontrarse en zonas geográficas diferentes así como por presentar variables genéticas propias que las hacen pertenecer a diferentes especies. Posteriormente se llevó a cabo un segundo perfilado cromatográfico, pero esta vez respecto al órgano de la planta, tomando muestras de la especie más representativa en cuanto a cantidad de material vegetal, así como aquella que contara con los cinco órganos estudiados, seleccionando así a la especie *L. mirabilis*, la cual aporta 15 ejemplares al estudio, estableciendo diferencias en cuanto a la variabilidad presentada de un compuesto determinado entre muestras de una misma especie.

3.3.2.1. Análisis de la producción de metabolitos en los órganos de un mismo espécimen.

Las plantas sujetas a estrés, a menudo acumulan metabolitos secundarios como respuesta a señales moleculares originadas por microorganismos patógenos o un ambiente desfavorable; la planta los reconoce por medio de receptores presentes en la célula vegetal. El reconocimiento de

estas señales moleculares genera una cascada de señalizaciones cuyo fin es activar los mecanismos de defensa de la planta (Martínez, 2007). Por lo anterior, la concentración de estos metabolitos varía en relación con las condiciones en las que se desarrolle la planta; este hecho lo evidencia el estudio realizado por Valares (2011) acerca de la variación de los metabolitos secundarios presentes en la especie *Cistus ladanifer* debido al genotipo y al ambiente, donde a partir de muestreos de especímenes de una misma zona en diferentes temporadas, concluye que al cuantificar la concentración de los metabolitos de estudio, estos presentan variaciones entre órganos, así como entre temporadas de colecta de una misma especie.

Con el fin de evaluar las anteriores variables, se realizó la comparación entre las partes de los ejemplares **2** y **14** (*L. bogotensis* y *L. pubescens*, respectivamente), como muestras representativas del género. La misma comparación se realizó para los especímenes **4**, **20** y **33** que se encuentran en anexos (figura 3.6 a la 3.8). Para todas las comparaciones se excluyó la primera señal (tiempo de retención de 2,6 min), al considerarse como una mezcla no resuelta de compuestos de alta polaridad (que puede observarse en todos los cromatogramas).

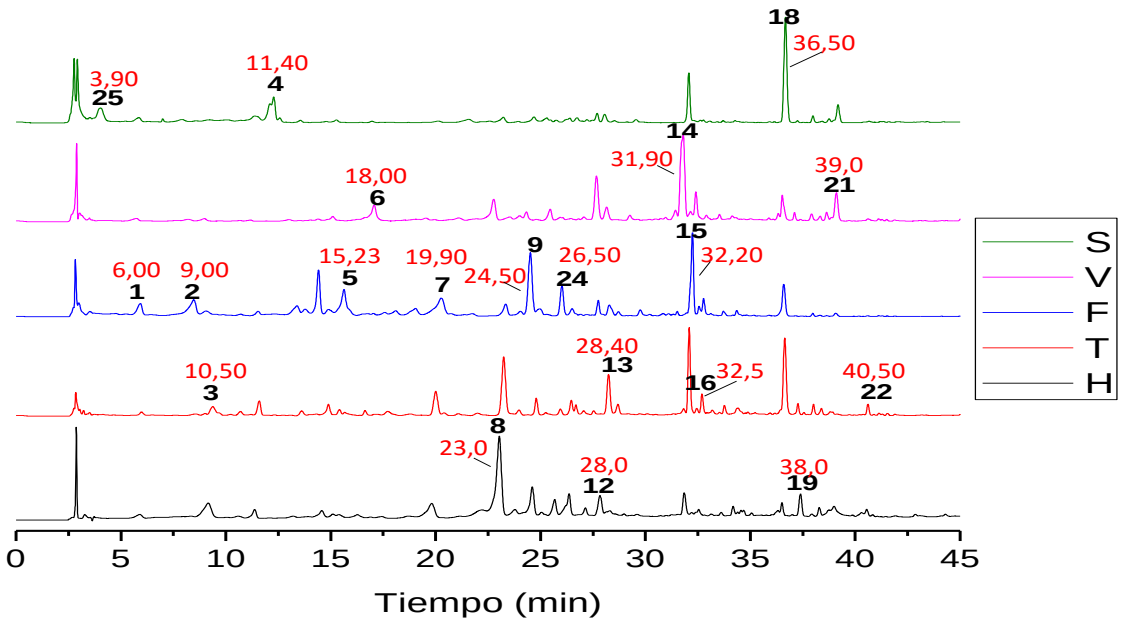


Figura 3.2. Perfiles cromatográficos de las diferentes partes del ejemplar **2** (*L. bogotensis*). H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas.

La comparación directa de los cromatogramas obtenidos para el espécimen seleccionado de la especie *L. bogotensis* nos permite observar similitudes respecto a la presencia o ausencia de algunos picos (Figura 3.2). Específicamente, el ejemplar **2** mostró un perfil comparable para hojas, tallos, flores y vainas en el rango entre 20 y 40 min. No obstante, se aprecian diferencias tanto en intensidad como en presencia de algunos picos, siendo un ejemplo claro el pico 24, el cual en flores presenta mayor intensidad que en hojas y tallos, mientras que en vainas y semillas no se logra apreciar; algo similar ocurre con el pico 25, el cual presenta alta intensidad tan solo en semillas, siendo difícil su identificación en los demás órganos (muy baja o nula intensidad). De otro lado, se hallan seis picos (8, 9, 14, 15, 16 y 18) caracterizados por encontrarse presentes de manera constante en todos los órganos de la planta, siendo isoflavonas cuya función en la planta se encuentra asociada con la regulación del crecimiento, protección contra el estrés y daño causado por la radiación solar (Solari, 2004).

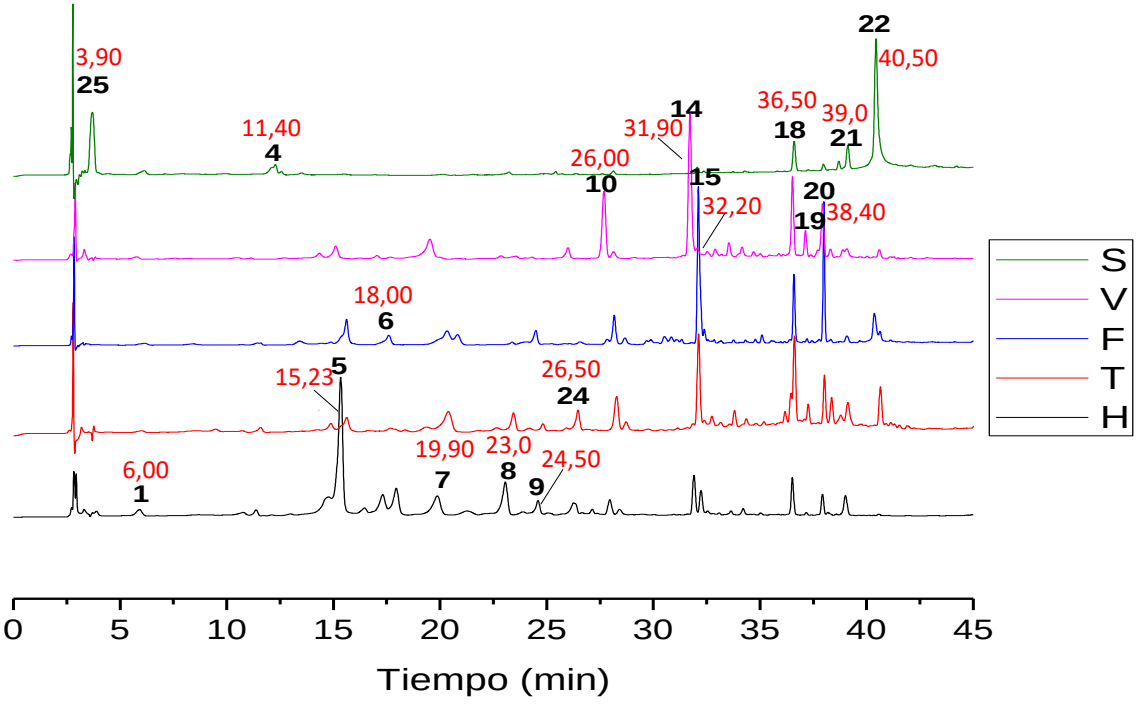


Figura 3.3. Perfiles cromatográficos de las diferentes partes del ejemplar **14** (*L. pubescens*). H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas.

En la especie *L. pubescens*, representada por la muestra **14**, se observa un comportamiento similar respecto a la primer especie mencionada, frente a la presencia de los picos 14 y 15, por lo demás se muestran señales de baja intensidad en todo el cromatograma, así como la ausencia de ciertos compuestos que posiblemente no fueron sintetizados; además, se presenta el pico 18, caracterizado por presentarse en intensidades altas en los perfiles de cada órgano a excepción de hojas. El espécimen **14** de *L. pubescens*, exhibe por su parte, una evidente diferencia en los compuestos presentes en hojas, donde se logra apreciar claramente tan sólo los picos 1, 5, 8, 9, 14, 15 y 18, de los cuales 8, 14 y 18, son compuestos asociados con la actividad antimicrobial (Muñoz, 2011). Se muestran a su vez, picos que están presentes en todos los cromatogramas en intensidades altas o bajas (10, 14, 15, 18, 19, 20, 21 y 22), este hecho puede significar que por lo menos para este espécimen, la producción de estos metabolitos es importante para su sobrevivencia. La variabilidad en la presencia de picos o respecto a las intensidades de los mismos, hace evidente las diferencias metabólicas de cada órgano, partiendo de las necesidades particulares de cada uno, desencadenando así su producción en la planta.

La cantidad de picos similares observados en las especies *L. pubescens* y *L. bogotensis*, sean varios o no, denotan algunas semejanzas en el comportamiento de los órganos de algunas especies, respecto a la presencia y contenido de metabolitos secundarios. Partiendo de dichas semejanzas, se hace necesario un análisis comparativo de cada órgano por separado aplicado a diferentes especímenes.

3.3.2.2. Análisis según el órgano de la planta

Teniendo en cuenta el elevado número de muestras y comparaciones posibles, se seleccionó *L. mirabilis* como especie representativa para ejecutar un análisis más detallado, ya que contiene un número importante de especimenes así como accesiones de un mismo especímen colectados en distintas temporadas (**4**, **4A**, **4B**, **4C**, **5**, **5A**, **5B**, **5C**, **6**, **6A**, **10** y **10A)**. Estas comparaciones buscan establecer si existe o no una variación en cuanto a presencia de los metabolitos identificados en distintas épocas del año, así como por zona de muestreo. Las diferencias entre

cada órgano presentadas a continuación, fueron contrastadas con los resultados en hojas por ser la parte que presenta mayor cantidad de compuestos.

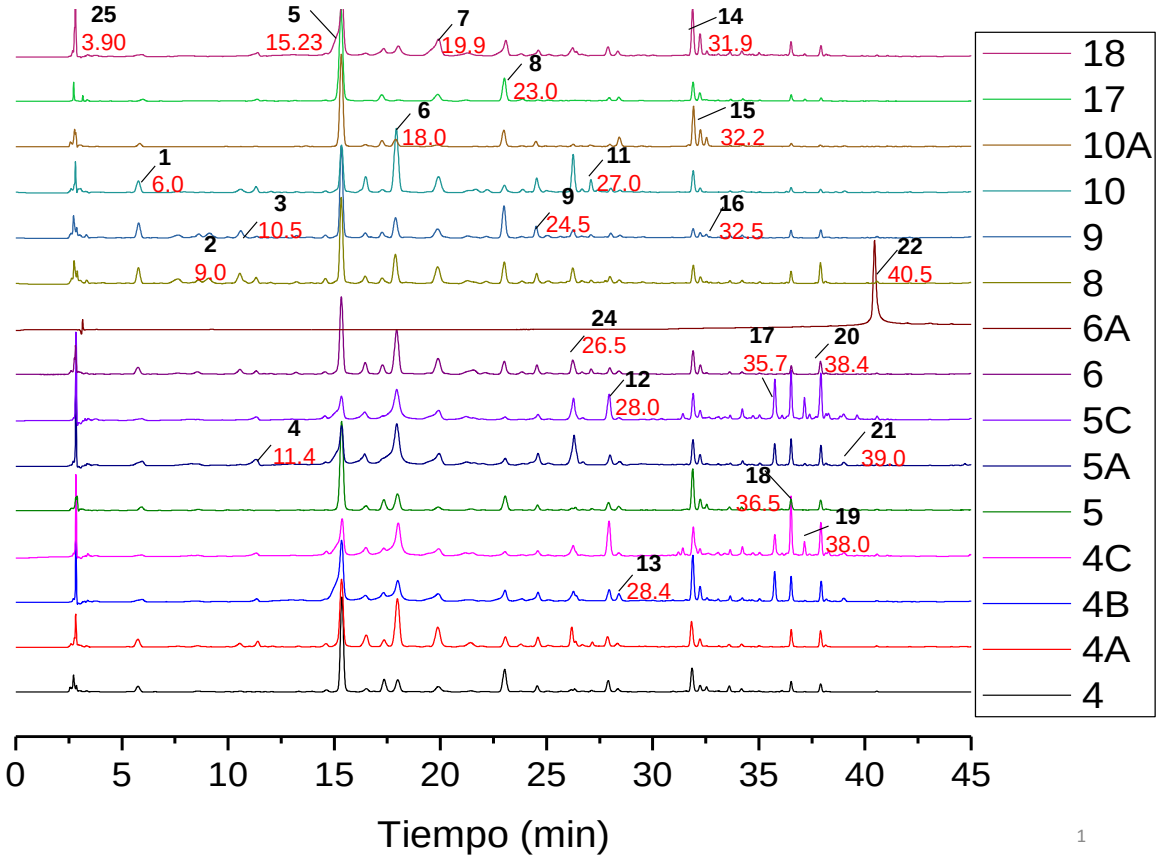


Figura 3.4. Cromatogramas de CLAE de los extractos etanólicos de hojas de *Lupinus mirabilis.*

Dentro de los 22 picos del análisis de hojas (Figura 3.4) se hallaron 8 compuestos caracterizados por encontrarse presentes en todos los especímenes de estudio, estos fueron los correspondientes a los picos: 1, 5, 6, 7, 8, 14, 18 y 20.

El pico 1 (furanocumarina) se observó en las muestras **4**, **4A**, **4B**, **5**, **5A**, y **6**, las cuales fueron colectadas en el páramo de Sumapaz durante la época lluviosa; según Rivera (2010) este ambiente humedo promueve la reproducción de hongos (germinación y proceso de infección), a este hecho se le podría atribuir la aparición de tal compuesto, ya que, las furanocumarinas han sido relacionadas con los diferentes mecanismos de defensa que poseen las plantas para

sobrevivir a los herbívoros y a los hongos patógenos (Mora, 2011). El pico 3 no se encuentra presente en las muestras **4C**, **5C** y **6A**, colectadas el mismo día en Usme, separadas unas de otras por escasos metros de distancia.

La ausencia del pico 3 puede indicar que la planta no se encontró expuesta a algún tipo de estrés que requiriera de la producción de tal metabolito para hacer frente a este hecho; en contraste, en los especímenes colectados en Cajicá (**8** y **9**) si se hizo presente dicho compuesto. La muestra **6A** cuenta con la presencia de pocos picos en comparación con las demás, visualizándose una señal de gran intensidad en el tiempo 40,5 min (pico 22); comportamiento que se aleja del espécimen **6**, el cual exhibe gran cantidad de señales; las diferencias exhibidas entre muestras de una misma especie, colectadas en temporadas diferentes, evidencian una clara variabilidad metabólica producto de algún cambio ambiental relacionado posiblemente por insidencia del clima o por ataques de predadores. El comportamiento del pico 17 resulta interesante para las muestra **4** y **5** colectadas en distintas temporadas, debido a que en la primera colecta de estos especímenes no se presentó dicho pico, pero al correr de los meses, se hizo evidente (especímenes identificados con las letras **B** y **C**). Este hecho se repite para el pico 19, encontrándose presente tan solo en muestras colectadas en Usme y aquellas identificadas con la letra **C**. La presencia de estos compuestos (luteona y wighteona) podría ser un indicativo de ataque por insectos, puesto que los rotenoides ostentan una fuerte actividad insecticida (Taiz, 2006).

El pico 5 se encuentra presente en todas las muestras, siendo el espécimen **6** el que mayor intensidad muestra; este compuesto por tratarse de una isoflavona, presenta actividad frente al ataque de patógenos, que según D'Agostina (2008), se ha encontrado en estudios con otro tipo de leguminosas, que existe una mayor tendencia a presentar grandes concentraciones de isoflavonas en hojas que en otros órganos de la planta, destacándose entre ellas al trébol rojo; atribuyéndose este hecho a la mayor frecuencia de ataque de patógenos a los cuales están sometidas las hojas.

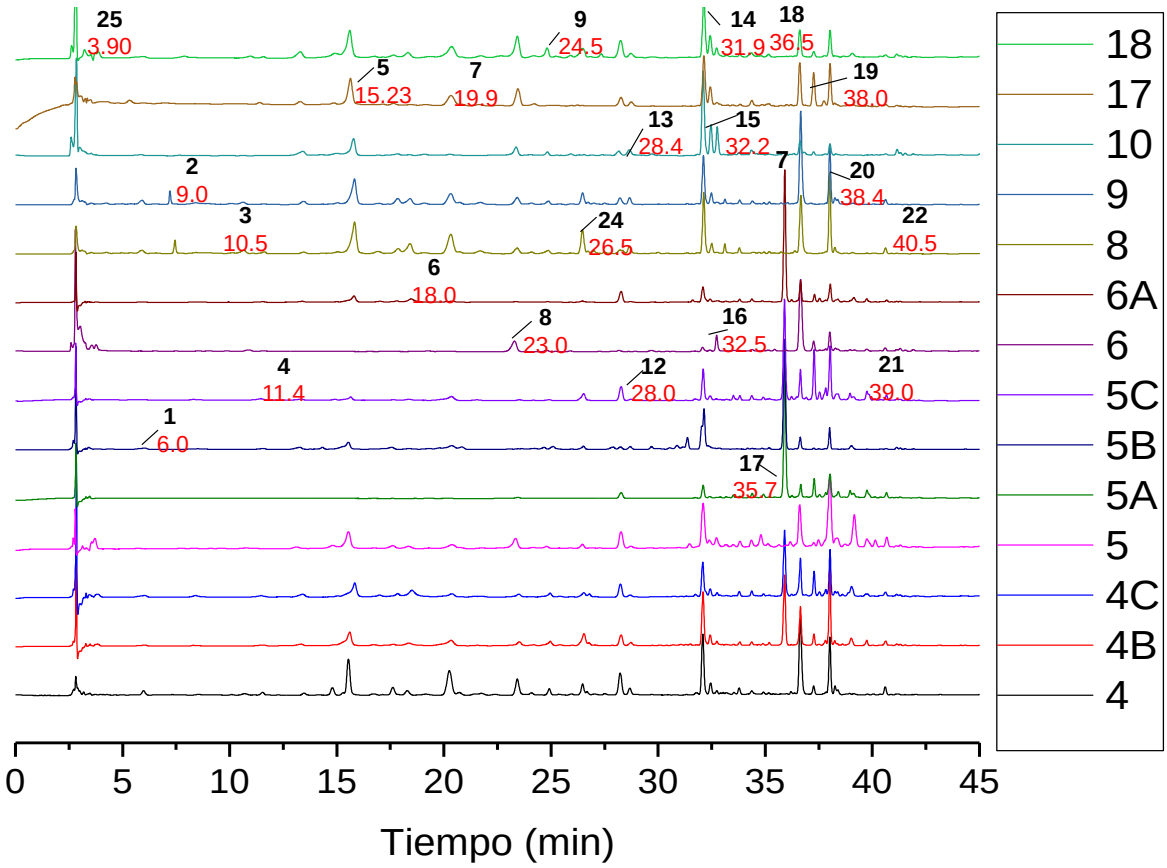


Figura 3.5. Cromatogramas de CLAE de los extractos etanólicos de tallos de *Lupinus mirabilis.*

En el análisis del cromatograma de tallos de la figura 3.5, no está presente el pico **5** en los especímenes **5A** y **6** (obtenidos en un mismo día de colecta), sin embargo, la muestra **10** obtenida en esa misma fecha, si presenta el compuesto en mención, pero al hallarse más alejada de la carretera, así como de posible contacto con seres humanos, el estrés sufrido resultó menor, lo cual podría conducir a que la planta no sintetizara este metabolito o por lo menos no lo hiciera en grandes concentraciones, lo cual lleva a pensar que la respuesta al ataque de posibles predadores exhibida en relación con la presencia de ciertos metabolitos, se puede asociar a una temporada en particular. Lo descrito anteriormente, indica que las vías metabólicas de estos metabolitos secundarios son complejas y las peculiaridades genéticas, factores ambientales, prácticas agronómicas, junto con la madurez de la planta tienen un impacto notable en la dinámica de acumulación cualitativa y cuantitativa de estos compuestos (Butkutė, 2014). La 7,4'-dihidroxiflavona 7-O-D-glucuronósido (pico 8) también se ausenta en los especímenes **5A** y **6**, sin embargo al transcurrir el tiempo el especímen **6** sintetizó dicho metabolito, ya que en **6A** no

se evidencia. El compuesto 18 sólo estuvo presente en las muestras **4**, **5** y **6** así como en sus diferentes colectas, lo cual genera un particular interés sobre los factores o posibles patógenos fúngicos que puedan estar afectando esa zona específicamente (Muñoz, 2011). En cuanto al pico 20, no presenta una relación evidente entre la temporada del año de colecta o la zona, pues se encuentra tanto en especímenes colectados en Usme como en Cajicá.

Los compuestos comunes en tallos y en hojas fueron los correspondientes a los picos 7, 11 y 17, mientras que la serie de compuestos relevantes solamente para tallos fueron 12, 14, 16, 19, 20 y 21.

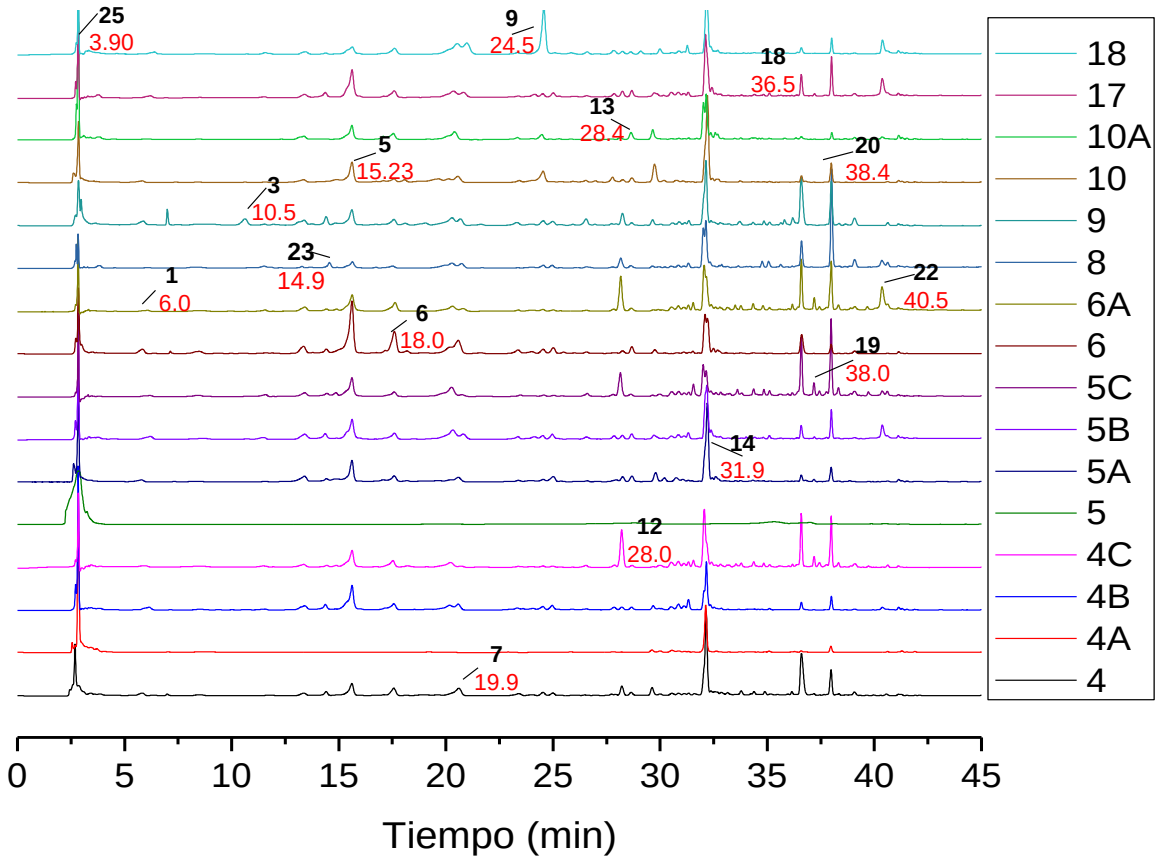


Figura 3.6. Cromatogramas de CLAE de extractos etanólicos de flores de *Lupinus mirabilis.*

El pico 1 (a diferencia de lo presentado en hojas) no evidencia en la mayoría de muestras de flores, contrario a ello, el pico 5 se encuentra presente, con intensidades altas en la mayoría de muestras de *L. mirabilis*, a excepción de **4A** y **5**. El compuesto **15**, por su parte, no está presente

en la muestra **5**, mientras que para el resto de especímenes exhibe gran intensidad. Se aprecia que contrario a lo expuesto en los análisis anteriores, el espécimen **5**, siendo un ejemplar de la primera colecta, presenta baja concentración de metabolitos en sus flores, comportamiento que no se repite con las muestras de esta misma planta colectadas en temporadas posteriores, este hecho podría relacionarse con algún tipo de alteración en el ambiente de la planta, ya sea por la presencia de predadores tales como insectos o el mismo hombre, y/o por cambios climáticos que condujeron a que en la temporada de colecta, las flores no necesitaran sintetizar dichos compuestos (Pérez, 2015). Ahora, las flores y las hojas tuvieron los siguientes compuestos en común: 11, 17, y 13; mientras que en flores fue más apreciable la presencia de 4, 18, 21 y 22. Siendo evidente que a pesar de compartir ciertos metabolitos entre órganos, existen compuestos que presentan su síntesis en órganos particulares, partiendo de la necesidad de cada uno, variando con ello su concentración. Se observa que a medida que transcurrió el tiempo, 18 y 20 min llegaron a una mayor concentración relativa (especímenes **4**–**4C** y **5**–**5C**), pero pasando por una época en la que casi desaparecieron (**4A** y **4B**). Así mismo, a medida que pasó el tiempo, se hizo claramente visible la existencia de 12 (**4C**, **5C**, **6A**). Particularmente, sólo la especie **18** resultó contener el compuesto 9 (al menos en gran proporción solo en esa muestra). También se puede observar que el compuesto 14 estuvo siempre presente en gran proporción sin importar la muestra (ubicación) ni la etapa de desarrollo o temporada, mientras que 5, 6 y 7 también parecen ser constantes (la escala no lo deja determinar con claridad), pero en concentraciones bajas y al parecer más variables que 14.

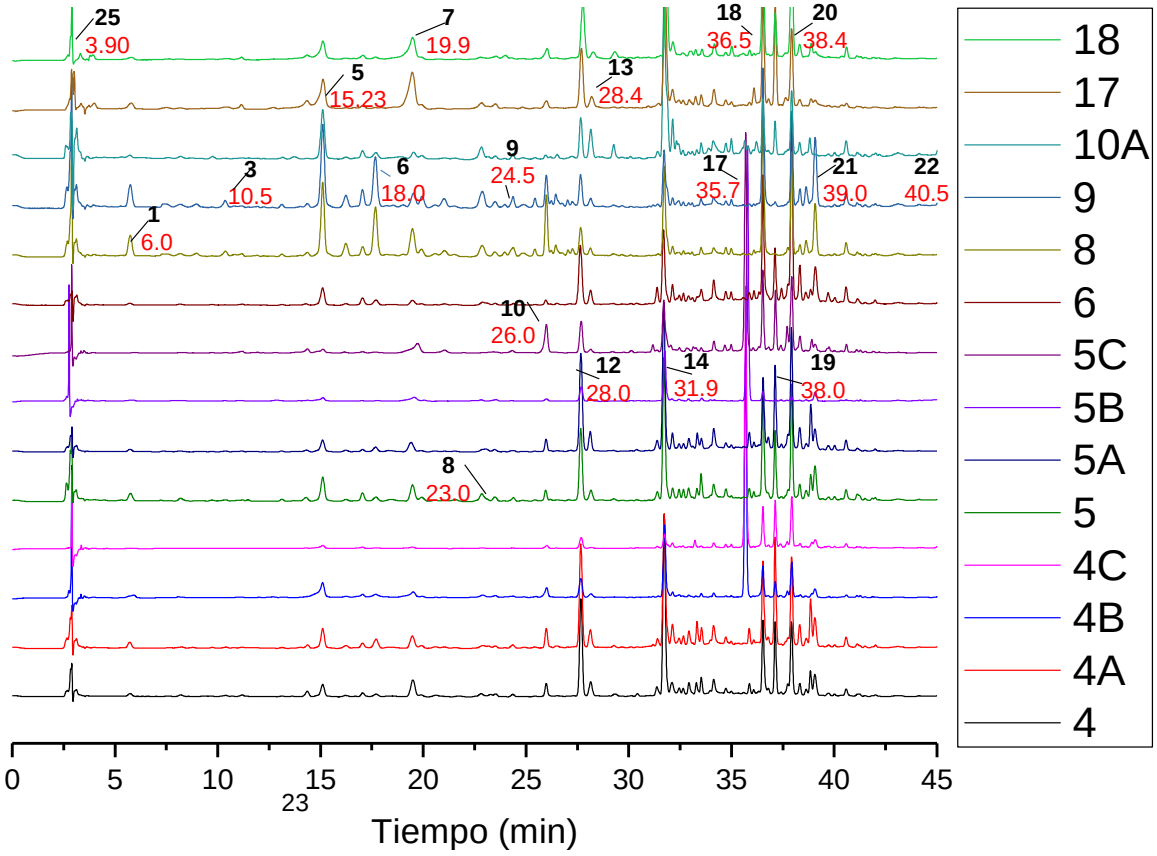


Figura 3.7. Cromatogramas de CLAE de los extractos etanólicos de vainas de *Lupinus mirabilis*

En el cromatograma para vainas de *L. mirabilis* (Figura 3.7), el pico 5, característico por contar con altas intensidades y encontrarse presente en la mayoría de muestras de flores de *L. mirabilis*, no está presente en **4C** y en las demás muestras se observa con bajas intensidades, indicando con ello que la isoflavona asociada tentativamente a este pico, se encuentra en bajas concentraciones en vainas de esta especie. De otro lado, en el rango entre 28 y 38,4 minutos, se tienen los picos 12, 14, 17, 18, 19 y 20, caracterizados por tener intensidades altas y encontrarse presentes en la mayoría de las muestras de flores, exceptuando el pico 17, el cual únicamente fue expresado por los especímenes **4B**, **4C**, **5B** y **5C**, esto quiere decir que entre marzo y julio de 2014 las vainas de dichas muestras desarrollaron esta isoflavona lo cual indicaría que en ese lapso, esta parte de la planta pudo ser atacada por patógenos fúngicos (Quiróz, 1983) y con el fin de defender a las semillas, se generó este compuesto, dado que según lo reportado por Muñoz (2011), presenta una importante actividad antimicrobial.

Al comparar los compuestos más representativos de vainas con las hojas se observó que hubo convergencia en los picos 11, 17, 13, 4, 12, 14, 19, 20, 21.

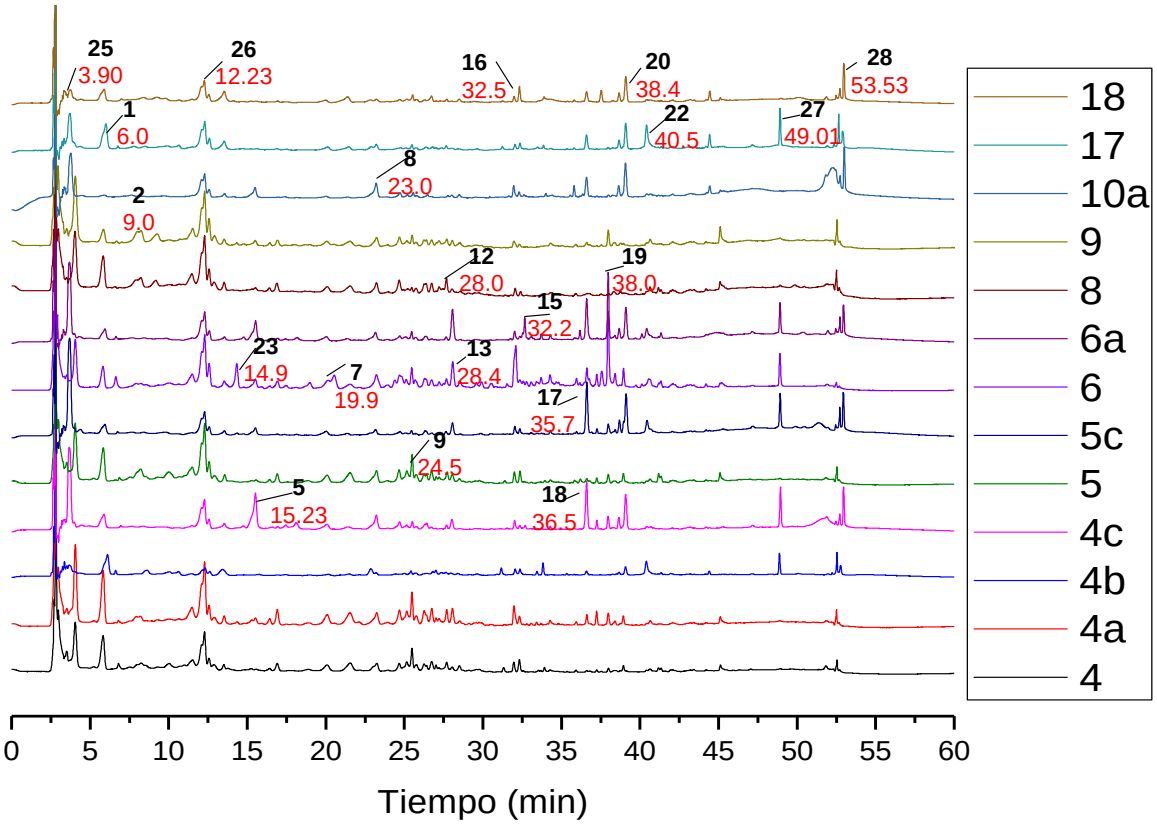


Figura 3.8. Cromatogramas de CLAE de extractos etanólicos de semillas de *Lupinus mirabilis*.

Los resultados de la cromatografía de extractos de semillas (Figura 3.8), en general, muestran disminución en intensidades de todos los picos registrados en comparación con los demás órganos, esto va de la mano con las bajas concentraciones obtenidas en el CFT, FL, así como de CCRL. La muestra **5**, que en flores mostraba pocas señales, en semillas cuenta con varios picos de intensidades bajas, destacándose tan solo los picos 23 y 26, por presentar la mayor intensidad entre las muestras; en contraste, el espécimen **5C** continua exhibiendo gran cantidad de picos, destacándose por ser una muestra con relativa constancia en cuanto a la presencia de gran cantidad de metabolitos en todos los órganos analizados. En semillas se puede llegar a relacionar la baja presencia e intensidad en las señales registradas con la baja concentración de sustancias de tipo flavoinoide presentes en éste órgano, encontrándose, sin embargo los picos 23 y 27, correspondientes a flavonas, desempeñando la función de proteger a las células del exceso de

radiación UV (Taiz, 2006), este hecho permitiría garantizar la reproducción de las plantas. También hubo presencia del alcaloide Ácido (2S)-2-[[2-(1H-indol-3-il) acetil]amino]butanedióico en este órgano, lo cual tiene setido partiendo del hecho que se ha reportado la presencia de este tipo de compuestos en este género como se ha expresado en trabajos anteriores; Ortega (2010) encontró que las semillas de *L. mutabilis* contienen 1,27g de alcaloides por cada 100g de muestra (Taiz, 2006).

Los picos 5 y 6 caracterizados por ser metabolitos de naturaleza muy similar, hacen parte de los flavonoides primarios denominados fitoestrogenos (De Vivar, 2006) los cuales exhibieron un comportamiento diferente en cada órgano, evidenciándose a partir de las intensidades observadas en el cromatograma; para hojas, la señal 5 fue de gran intensidad y tan solo estuvo ausente en la muestra **6A**; para el caso del pico 7, la intensidad fue media y las mayores intensidades se presentaron en los especímenes **4A**, **5A**, **6** y **10**. En tallos las intensidades fueron muy bajas para el pico 6, mostrando en tan solo cinco especímenes intensidades altas (**8**, **9**, **10**, **17**, **18**); el pico 7, al igual que el 6, se encuentra ausente en las muestras **5A**, **6** y **6A**; en flores y vainas el pico 6 presenta mayores intensidades que el 7, mostrando en semillas señales muy bajas. Finalmente, las semillas tuvieron como compuestos comunes 7, 12, 13 y 17, los compuestos 1, 23, 25 prevalecieron en estas.

Con lo anterior se hace evidente la variabilidad presentada por los especímenes en relación con los compuestos identificados tentativamente, entre ellos mismos según cada órgano evaluado, y por supuesto entre las diferentes especies; no obstante, los compuestos 1, 5, 8, 14, 18, 19, 21 y 22 estuvieron presentes en la mayoría de partes de la plantas estudiadas en una mayor o menor concentración, pero no en la totalidad de extractos, evidenciando así que la presencia de determinados metabolitos en la planta depende en gran medida de las condiciones de su entorno, las cuales interfieren en el comportamiento de la planta; dichas perturbaciones incluso pueden ser simples, como el tránsito de un animal por la zona donde se encuentra, pero capaces de desencadenar la producción de metabolitos específicos para su defensa, modificando así los resultados de los análisis cuantitativos presentados por cada espécimen muestreado.

Cualquier clase de alteración en el entorno ocasiona en la planta numerosos mecanismos de defensa para contrarestar el estrés ambiental. La defensa química, que se basa en la secreción de

metabolitos secundarios, es congruente con la variedad y variabilidad en los metabolitos de los especímenes estudiados; la presencia de estos le concede a las plantas ventajas selectivas y adaptativas frente a otras (Valares, 2014). De tal manera que su síntesis puede deberse a diferentes necesidades que puede llegar a presentar la planta dependiendo de las condiciones ambientales y/o biológicas que esta requiera para un periodo determinado; entre estas se encuentran la defensa contra depredadores y patógenos, atracción de polinizadores, entre otros (Taiz y Zeiger, 2006), dicha síntesis se encuentra determinada por las condiciones ambientales, en las que influyen factores bióticos como los herbívoros y abióticos como la luz ultravioleta, temperatura, déficit hídrico y de nutrientes del suelo (Valares, 2014). Este efecto generado por la interacción con el ambiente se conoce como plasticidad fenotípica (Falconer, 1898 Citado por Valares, 2011), es decir, la capacidad de un organismo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el ambiente (Gianoli, 2004); dichos cambios producen desde grandes diferencias hasta ligeras variaciones en sus compuestos, siendo los metabolitos secundarios los primeros en sufrir tales modificaciones (Valares, 2011).

Los resultados anteriores han permitido encontrar algunas diferencias entre las muestras, dentro de un mismo espécimen, según el órgano o la especie; sin embargo, es difícil decidir cuándo se trata de diferencias significativas y cuándo no. Además, la comparación directa de perfiles es un proceso tedioso, de alto consumo de tiempo, que está limitado por el observador. Por tanto, se hace necesaria la implementación del análisis multivariado como conjunto de métodos estadísticos que permiten el análisis simultáneo de múltiples variables medidas para cada objeto de estudio. Siendo una herramienta fundamental para el desarrollo del presente trabajo de investigación, al permitir el procesamiento de los datos obtenidos de los métodos cuantitativos y transformarlos en verdaderos análisis, brindando una respuesta sólida a las hipótesis planteadas al inicio de cada investigación.

3.4. CONCLUSIONES

La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas permitió la separación y posterior detección de compuestos químicos presentes en los extractos vegetales de cinco especies del género *Lupinus*, los cuales pudieron ser identificados de manera tentativa teniendo como soporte la base de datos MassBank, consultada haciendo uso del espectro de masas de cada compuesto resuelto; haciendo uso del ión molecular como herramienta fundamental e indispensable para conocer acerca de la identidad de un compuesto desconocido (Portolés y otros, 2011). Se habla en términos de una identificación tentativa porque se hace uso de espectros de masas de baja resolución, puesto que los métodos de ionización se consideran "blandos", los productos de los espectros cuentan con menor fragmentación y tiene el fin de mantener la molécula intacta (Portolés y otros, 2011). A razón de ello la fragmentación de los iones moleculares protonados o desprotonados generados es generalmente limitada, y los espectros de masas son relativamente simples (Ho y otros, 2003). Por lo tanto, la cantidad de semejanzas arrojadas por la librería se basan en el pico de ion molecular, mas no en fragmentaciones, es así que la elección final en la identificación de los compuestos está dada según criterios del investigador. De tal forma que este tipo de aproximaciones conduce al planteamiento de una posible estructura, no en una identificación confirmada, ya que queda un cierto margen de duda sobre la identidad estructural, principalmente para compuestos nuevos e isómeros, entre otros, debido a la abundante posibilidad de compuestos que arroja la base de datos en un mismo ion molecular (Stashenko y Martinez, 2009). Sin embargo la identificación tentativa sigue siendo relevante, puesto que genera un acercamiento a la identidad de los compuestos presentes en una matriz compleja, por ejemplo, el extracto de una planta, todo ello con datos obtenidos de forma experimental.

Es así que la presente investigación con ayuda de la técnica analítica de CLAE-EM, así como de la base de datos Massbank, llevó a la identificación tentativa de 28 compuestos presentes en los extractos de las cinco especies estudiadas, todos ellos pertenecientes a la familia *Fabaceae*, 16 han sido reportados en otras especies de *Lupinus*, 26 son flavonoides, 1 esterol y 1 alcaloide, según lo reportado en la base de datos MassBank. Para las cuales se realizó la evaluación de los cromatogramas realizados tanto por órgano como por especie, frente a la variabilidad metabólica

de cada extracto; dicho estudio no mostró una relación directa entre la presencia de ciertos compuestos y la especie de proveniencia del extracto, siendo variable el comportamiento metabólico de los compuestos en cada especie. Este hecho sin embargo parece ser diferente en cuanto a la caracterización por órgano ya que si bien no presenta un comportamiento que se podría denominar predecible, si se pueden establecer ciertas relaciones respecto a la fecha y lugar de colecta de la muestra, que en algunos especímenes (denominados con las letras **A**, **B** y **C**) siendo tomados de la misma planta, pero en fechas de muestreo diferentes, presentan cierto patrón de comportamiento que puede estar relacionado con la geografía de la zona y su cercanía o no a asentamientos humanos, ataque de plagas y/o predadores, lo que por referencia, puede ser causal de estrés en la planta y por ende hace proclibe a que la misma produzca determinados metabolitos para contrarestarlo.

Independientemente de la parte de la planta o de pertenecer a una misma especie el metabolismo secundario exhibe diferencias entre los compuestos; si bien genéticamente el género y la familia muestran similitudes (Romero, 2004) la interacción con el medio hace que la habilidad individual para enfrentar o responder a diferentes condiciones ambientales no sea la misma, este es uno de los medios por los cuales las plantas pueden ajustar su morfología y fisiología permitiéndoles enfrentarse a la heterogeneidad ambiente natural (Palacio y Rodríguez, 2008).

3.5 REFERENCIAS

- Atkins, P y Jones, L. (2006). Principios de química: los caminos del descubrimiento. Estados Unidos: Editorial Médica Panamericana. p. 326.
- Aljama, A., Hassan, A., Hammad, A y Barawy, A. (2009). Incidence of aflatoxigenic fungi in frozen and canned fishes and trials to inhibit aflatoxin production by use of some minor elements and lupinus termis seeds, Life Science Journal 2012; 9, p 27
- Barrón. R, García. M y Soto. R (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora*, Rev. Fitotec. Mex. Vol. 34 (3), 151-157.

- Boinik, V., Akritidu, Kh. P., y Demeshko, O. V. (2015). Phenolic compounds from roots of Lupinus polyphyllus. *Chemistry of Natural Compounds*, 51*(2),* 352.
- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., May, G. D., Mendes, P., Dixon, R. A., and Sumner, L. W. (2005). Metabolic profiling of Medicago truncatula cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J. Exp. Bot. 56*, 323-336.
- Butkutė, B., Lemežienė, N., Dabkevičienė, G., Jakštas, V., Vilčinskas, E.,y Janulis, V. (2014). Source of variation of isoflavone concentrations in perennial clover species. *Pharmacogn Magazine*, *10,* 181-188.
- Campbell, N. (2005) *Biología*. Editorial medica Panamericana: Madrid, España, p.756
- Ciappini, M., Stoppani, F., Martinet, R., Alvarez, M. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y favonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 15(19), 45-51.
- D'agostina, A., Boschin, G., Resta,D., Annicchiarico, P., y Arnoldi, A. (2008). Changes of Isoflavones during the Growth Cycle of *Lupinus albus. J. Agric. Food Chem.,56, 4450–4456.*
- De Vivar A, (2006). Química de la flora Mexicana. Investigaciones en el instituto de Química de la UNAM, Mexico, D.F, p.63.
- Díaz, E., Sacristán, M. Alarcón, B., Córdoba, V., y Legaz, E. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte II. Práctica de laboratorio: análisis cuantitativo básico. *Reduca (Biología). Serie Técnicas y Métodos*. 4 (*3*): 33-47
- Esquivel, E., y Leal, L. (2004). Cromatografía de fase reversa. Universidad Nacional Autónoma De México, Instituto De Biotecnología. p. 46.
- Flanagan, R., Taylor, A., Watson, I., y Whelpton, R. (2008). Fundamentals of Analytical Toxicology. Reino Unido: John Wiley & Sons. p.266.
- Frański, R., Bednarek, P., Siatkowska, D., Wojtaszek, P., y Stobiecki, M. (1999). Application of mass spectrometry to structural identification of flavonoid

monoglycosides isolated from shoot of lupin (*Lupinus luteus L.*). *Acta Biochim Pol*, 46(*2*), 459-473.

- Gianoli, E., Palacio, K. (2004). Phenotypic integration may constrain phenotypic plasticity in plants, *118*, 1923-1925.
- Grimalt, S. (2009). Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. (Tesis Doctoral). Universitat Jaume I, p. 26.
- Guemes, N., Martínez, J., Hernandez, J., Yanez, J., y Totosaus, A. (2012). Comparison of Chemical Composition and Protein Digestibility, Carotenoids, Tanins and Alkaloids Content of Wild Lupinus Varieties Flour. *Pakistan Journal of Nutrition*, *11*(8), 676-682.
- Harborne, J., Ingham, J., King, L y Payne, M. (1976). The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectional antifungal agent in the genus Lupinus. *Phytochemistry*, *15*, 1485-1487
- Harris, D. (2006). *Proceso analítico.* Análisis químico cuantitativo: España, Ediatorial Reverté. p 640
- Heinrich, M. (2005). Estudios metabolómicos - Nuevas oportunidades para la fitoquímica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 4, núm 6.
- Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K.,Law, L.K., Lit, L.C.W., Suen, M.W.M., y Tail, .H.L. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. Clin Biochem Rev, 24(*1*), pp.3-12.
- Horai H y otros (2010). Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0035, Japan.
- Ingham, A., Tahara, S., & Harborne, J. (1983). Fungitoxic Isoflavones from Lupinus albus and other Lupinus Species. *Z. Naturforsch*, *19*, 194-200.
- Katajamaa. M, and Orešič. M, (2005). Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. US national library of Medicine. National Institutes of Health. Published on line 10.1186/1471-2105-6-179

- Khalid, H. Newinger, D. (1994). *African Ethnobotany.* Poisons and Drugs. Chapman and Hall. Stuttgart, Germany. p 273.
- Keeler. R and Tu. A. (1991). *Handbook of natural toxins.* Toxicology of plants and fungal compounds. Marcel Dekker INC. New York, Unites States. p 102- 104.
- Lucio, J. (2012) Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales. (Tesis de doctorado). Universitat Autonoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Martínez, R (2007) Farmacognosia. (Tesis de doctorado). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, p 8.
- Martínez, S. (2013). *Métodos de validación de identificaciones a gran escala de proteínas y desarrollo e implementación de estándares en proteómica.* (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Martínez. S, González J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acción antioxidante. Departamento de fisiología. Universidad de León y Hospital de León. España. S.V.R 318.
- Mora, A., Torres, R., Hernandez, C., y Stashenko. (2011), E. Constituyentes de los aceites esenciales de las hojas de Hymena courbaril. En línea: http://www.unalmed.edu.co/~proquive/otros/Accion_biologica.htm
- Muñoz, M. (2011). Caracterización de genes involucrados en la biosíntesis de isoflavonoides y su asociación con la resistencia a antracnosis en *Lupinus albus.* (Tesis de Doctorado). Universidad Austral De Chile, Facultad De Ciencias Agrarias: Chile.
- Nielsen, N., Carstensen, J. M.; Smedsgaard, J. (1998). Aligning of single and multiple wavelength chromatographic. *Journal of Chromatography A*, *805*, 17–35.
- Nordstrom, A., Want, E., Northen, T., Lehtio, J., and Siuzdak, G. (2008). Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics. *Anal. Chem*. *80*, 421-429.
- Organero, A.(2002). *Conceptos básicos de botánica*. Universitat de Valencia: Valencia, España, p.7.

- Ortega, D., Rodríguez, A., David, A y Zamora-Burbano, A. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. Revista de la Universidad Nacional de Colombia, *59*(1).
- Ospina, M. (2003).El páramo de Sumapaz un ecosistema estratégico para Bogotá. Mundo ambiental Bogotá, en línea https://mundoambientalbogota.wordpress.com.
- Palacio-López, K., Rodríguez-López, N. Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* (VERBENACEAE) en respuesta a la disponibilidad hídrica en dos ambientes lumínicos. (2008). *Acta biol. Colomb, 13*(1), pp. 187-198.
- Papp, P. Apáti, V. Andrasek, A. Blázovics, A. Balázs (2004), Analisis de antioxidantes fenólicos en plantas a partir de CLAE-MS, *Chromatographia*, *60*(1), pp 93-100.
- Pérez, M., Lagunes, L., López, J., Aranda, E y Rámos, J. (2015) Composición química de especies silvestres del género *Lupinus.* Del estado de puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana. *38* (1). 49-55.
- Piasecka, A., Rodziewicz, V., Swarcewicz, B., y Chmielewska, K. (2012). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes, *Springer ink, 36*(1), 1-19.
- Portolés, T., Pitarch, E., López, F., Hernández, F., y Niessen, W.M.A. (2011). Use of soft and hard MS ionization techniques for unknown compounds elucidation by GC-TOF-MS. University Jaume I: España.
- Quiroz, C. (1983). Plagas del poroto en el follaje y la vaina. *La platina, 15.* p *4-7*
- Rangel, O. (2000), Colombia: diversidad biotica, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, p 238.
- Rivera, A. (2010). Inducción de resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno. Colombia, Tolima: Universidad del Tolima. p. 25.
- Rodriguez, C. (2013). Nuestro municipio - Cucaita. Boyacá, Colombia. Recuperado de: http://www.cucaita-boyaca.gov.co/informacion_general.shtml.
- Romero, D. (2004). *Plantas Aromáticas*. Buenos Aires: Editorial Kier. p 35
- Siger, A., Czubinski, J., y Kachlicki, P. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species, *Journal of food composition and analysis, 25,* 190-197.
- Silva, C., García, M. (2006). Laboratorio de Bioquímica. *Técnico superior en laboratorio de diagnóstico químico*. Madrid, España: Editorial Mad, S.L, Capitulo 2, p 25.

- Solari, M. (2004). *Las isoflavonas: su relación con la enfermedad renal y otras patologías crónicas concominantes*. Buenos Aires: Argentina, p.4
- Skoog, A., West, D., James, F y Crouch, S. (2005). *Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.* Principio de análisis instrumental. México: International Thompson Editores, S.A, p 168.
- Stashenko, E., Martinez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica, 3*(1), pp.31-49.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Castellón de la Plana, España: Universitat Jaume I. p 542.
- Taylor, P. (2004). Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit*, 26(*2*), 215-219.
- Uribe, J., Zamora, J y Bañuelos, J. (2015) Flavonoid profile of Lupinus mexicanus germinated seed extract and evaluation of its neuroprotective effect, Trabajo de grado Institute of Bioorganic Chemistry PAS, Poznan, Poland. pp 56
- Valares, C. (2011). *La plasticidad fenotípica es la capacidad de un organismo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el ambiente*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Extremadura: España. p 204.
- Valares, C. (2014). *Defensa química en plantas: variación debida al ambiente y genotipo: Estudio del metabolismo secundario en el matorral mediterráneo*. España: Publicia. p 117.- 119.
- Van der Greef J, Davidov E, Verheij E, Vogels JTWE, van der Heijden R, Adourian AS, Oresic M, Marple EW, Naylor S. (2003) The role of metabolomics in systems biology: A new vision for drug discovery and development. *Kluwer Academic Publishers*. 171-198.
- Van Wyk, B., Grelnwaldt, R., & Wittes, L. (1995). Alkaloid Variation in the *Lupinus pusillus* group (Fabaceae: tribe Genisteae), *Biochemical Systematics and Ecology, 23*(5), p 533-537.

- Wojakowska., A, Muth., D, Narozna,. D, Madrzak., C, Stobiecki., M, y Kachlicki., P. (2013), Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (Lupinus angustifolius) plants to infections with Colletotrichum lupini fungus or treatment with its toxin, *Metabolomics*, *9*, p 575–589.
- Wojakowska.A, Piasecka., A,García-López., P.Zamora-Natera., F, Krajewski., P, Marczak., L, Kachlicki., P, y Stobiecki., M. (2013), Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC–MS techniques, *Elsevier*, *92*, p 71–86.
- Yaber, M., Ciancia, M., y Leicach, S. (2009). Variación en la producción de alcaloides en inflorescenciasde *Senecio Grisebachii* por deficiencia de nutrientes. *Cienc. Suelo*, p 27(*1*).
- Yanez, J., Güemes., J. Martinez., F. Hernandez y A. Totosaus. (2012). Comparison of chemical composition and protein digestibility, carotenoids, tannins and alkaloids content of wild Lupinus varieties flour. *Pakistan Journal of Nutrition*,*11*, 676-682.
- Zhentian., L, Huhman., D y Sumner., L. (2011). Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Published online 10.1074/jbc.R111.238691

CAPÍTULO 4:

Relaciones metabólicas en especies pertenecientes al género *Lupinus* a partir del perfilado cromatográfico y datos cuantitativos.

4.1. INTRODUCCIÓN

En principio, los metabolitos primarios y secundarios no se pueden diferenciar sólo basándose en su estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos. En ausencia a una distinción válida entre ambos compuestos metabólicos, se tiene en cuenta su función, de modo que se denominarán metabolitos primarios a aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos de la planta; mientras que metabolitos secundarios serán aquellos que permitan interacciones ecológicas de la planta con su entorno (Valle, 2011); es decir, los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que no cumplen una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, entre otros, y que a diferencia de los metabolitos primarios, tienen una distribución restringida en el reino vegetal, sintetizándose en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando su producción restringida a ciertos géneros, familias y en algunos casos a especies de plantas (Ávalos y Pérez, 2009). Teniendo en cuenta esto, el estudio del metaboloma se ha venido utilizando cada vez más en el diagnóstico clínico, ya que el perfil metabólico da la opción de indagar acerca del funcionamiento celular y desentrañar los mecanismos bioquímicos implicados para así relacionarlos con el fenotipo observado (Beltrán y Yanes, 2012).

Desde principios de la década de los noventa, ha ido emergiendo la metabolómica, denominada como la última de las ciencias ómicas, ya que surgió después de la genómica y proteómica. La metabolómica cataloga y cuantifica a las moléculas pequeñas, es decir, se refiere al estudio, la identificación y cuantificación sistemática de compuestos de bajo peso molecular

en ciertas células, tejidos o fluidos biológicos que son producto de las reacciones metabólicas que se localizan en los sistemas biológicos; además estudia los cambios en los perfiles metabólicos dentro de un organismo como respuesta a determinada situación, ya sean enfermedades o estrés (Dunn y otros, 2005 citado por García Mier y otros, 2012). Se considera una analogía con la palabra genoma, ya que, esta denota la totalidad de la información genética y el metaboloma representa la totalidad de los metabolitos dentro de un sistema biológico (McNiven y otros 2011 citado por García Mier y otros, 2012).

Los estudios metabolómicos pueden abordarse de dos formas: en uno de los casos se conoce el tipo de metabolitos de interés, permitiendo la realización de una aproximación denominada dirigida. En el otro caso, cuando no se tenga información previa de los metabolitos que puedan estar implicados en un proceso biológico/bioquímico en concreto, se puede llevar a cabo una aproximación no dirigida (Beltrán y Yanes, 2012).

En las aproximaciones no dirigidas se busca determinar simultáneamente todos los metabolitos que sea posible para obtener una visión global del problema de interés. Dado que para este tipo de aproximación no se posee información de antemano del problema que se plantea, es particularmente importante desarrollar un estudio experimental muy detallado para poder detectar el máximo número posible de metabolitos sin introducir ningún sesgo (Valcárcely Lucena,2012). Se necesita para el estudio metabolómico no dirigido de diferentes técnicas analíticas que sean complementarias entre sí (Nevedomskaya y otros, 2011), debido a la gran disparidad de estructuras químicas de los metabolitos, no existe ninguna técnica que permita detectarlos paralelamente. Sin embargo, tanto la accesibilidad a los distintos equipos como la cantidad de muestra disponible, hacen que la técnica más utilizada para realizar estudios de metabolómica no dirigidos sea la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Yanes y otros, 2011). Tal evolución no habría podido ser implementada sin los avances tecnológicos en RMN (otro pilar de la metabolómica junto con EM) (Cardona y otros, 2003).

Dichas técnicas analíticas trabajan en paralelo con la bioinformática, que comprende todas aquellas herramientas informáticas y de tratamiento estadístico que permiten tratar una gran cantidad de datos y simplificarla de manera que el analista sea capaz de interpretarlos y llegar a un análisis mas profundo involucrando tanto resultados cuantitativos como cualitativos (Patti y otros, 2012). En los últimos 5 años, la aplicación de la metabolómica se ha demostrado sobre

extractos de *Ginkgo* y la evaluación de los fitofármacos que contiene, en términos de sus características químicas y actividad antioxidante (Ronowicz, 2013); así como en lotes de café comercial analizando la caracterización, tipificación y homogeneidad mediante la aplicación de técnicas no supervisadas (Box-plot y ACP) y supervisadas (SIMCA) (Vázquez, 2011). Kowalczuk (2015) aplicó la quimiometría en la identificación de plantas psicoactivas, siendo el ACP el método elegido para la exploración de datos.

Es así que la metabolómica se ha aplicado a diversos campos, entre los que se cuenta el estudio de las plantas medicinales, lo cual ha aportado conocimiento valioso. Con base en lo anterior, en el presente capítulo se busca discriminar los datos cuantitativos (CFT, FL y CCRL) y de perfil químico (CLAE y CLAE-EM) con el fin de establecer relaciones en el metabolismo secundario.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. General

Se realizó un análisis estadístico, tomando como técnica de síntesis de información el análisis de componentes principales (ACP), el análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ), y la regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales (MCPO) con ayuda del software SIMCA (v 13.3, Umetrics).

4.2.2. Tratamiento de datos

Los datos cromatográficos deben tener un procesamiento previo debido a que la posición de los picos puede cambiar entre análisis, a razón de pequeñas variaciones en las muestras o en las condiciones del cromatógrafo (Lucio, 2012); este tratamiento parte de la normalización y escalado, disminuyendo así la cantidad de variables inconsistentes dentro de un conjunto de valores, posterior a ello se llevó a cabo la alineación de los datos, para lo cual se trataron las señales a partir del algoritmo de alineación COW (Correlation Optimization Warping)(Nielsen y otros, 1998). Las alineaciones se realizaron para todas las muestras por cada órgano de la planta,

seleccionando como patrón, la muestra que presentara mayor cantidad de picos de intensidades definidas, empleando para ello el software MATLAB ® 2013A.

4.2.3. Análisis multivariado de datos cuantitativos

Se construyó una matriz con los datos cuantitativos (CFT, FL y CCRL) para las muestras de hojas, tallos, flores, vainas y semillas; luego fue sometido a ACP.

4.2.4. Análisis multivariado de la totalidad de perfiles cromatográficos.

Posteriormente y con el fin de establecer relación entre las posibles variables y las muestras de todas las partes de la planta estudiadas (hojas, tallos, frutos, vainas y semillas) se construyó una matriz considerando el perfil cromatográfico para todas las muestras. Es decir, intensidad de señal (CLAE-DAD a 270 nm) en función de tiempo para las 196 muestras. Esa matriz fue sometida a MCPO-AD.

4.2.5. Análisis multivariado con perfiles cromatográficos por cada órgano.

Con base en el análisis anterior se realizó un ACP a cada parte de la planta, permitiendo con ello la homogenización de los datos, para posteriormente agruparlos tratando de encontrar la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre agrupaciones. Las similitudes se calcularon sobre la base de la distancia euclídiana a través del ACJ y se obtuvo cada dendrograma, el cual permitió crear tipologías y agrupamientos que facilitan la comparación de los datos tanto cualitativos como cuantitativos.

4.2.6. Análisis supervisado

Finalmente a las matrices de análisis multivariado con perfiles cromatográficos por cada órgano de la planta, se les realizó un análisis MCPO, emplenado para ello la CFT como variable de supervisión.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Análisis de datos cuantitativos

El estudio multivariado de datos comprende una serie de métodos para analizar gran cantidad de variables simultáneamente, cuando éstas presentan interdependencia (Mancera y otros, 2003). El análisis de componentes principales (ACP), por su parte, es una técnica estadística de síntesis de la información, donde los nuevos componentes principales serán una combinación lineal de las variables originales siendo independientes entre sí (Térradez, 2012), en este sentido, es el primer paso para, a partir de una matriz con muchas variables, reducir el número de datos de forma que se pierda la mínima cantidad de información posible; para lograrlo, transforma las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando con ello la interpretación de los datos (Saporta, 2011). Asì mismo, se usó el análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ), el cual posibilita la agrupación de variables tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos (De la Fuente, 2011). Estas agrupaciones son, en alguna medida, similares a los factores obtenidos en el ACP, pero en otra parte no, ya que con el ACJ no se permiten ítems multidimensionales (López y otros, 2008).

En las gráficas se han señalado subagrupaciones con óvalos, que resaltan cómo dentro de las agrupaciones formadas por el ACJ se establecen, a su vez, pequeños grupos a partir de especímenes que hacen parte de una misma especie y que en algunos casos comparten fecha y/o lugar de colecta.

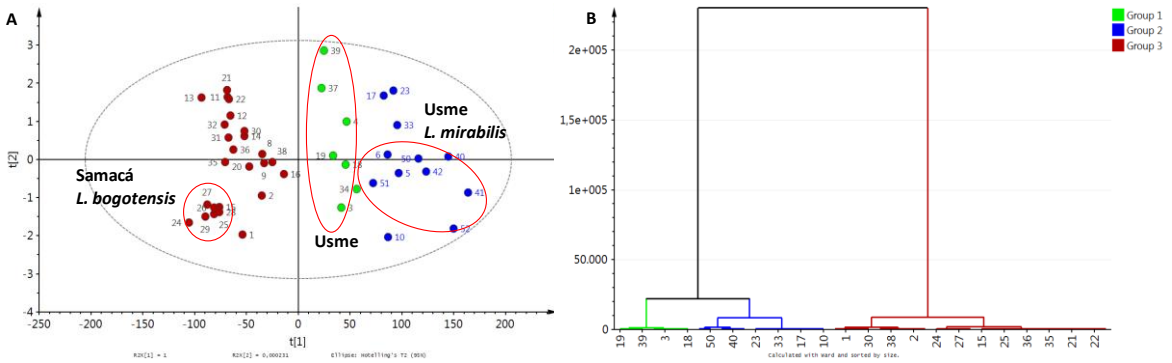


Figura 4.1. Análisis de componentes principales (ACP) y Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con la caracterización química de los extractos etanólicos de hojas de especies

de *Lupinus.* **A.** Score scatter plot. **B**. Dendrograma. Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.

En la figura 4.1.B se observa el dendrograma para hojas, este es un diagrama que muestra las distancias de atributos o muestras. Para evitar cruzar líneas, el diagrama se expone gráficamente de tal modo que los miembros de cada par de clases que se fusionan son elementos próximos (González y otros, 2013). De tal manera, que las agrupaciones con menor distancia entre ellas indican que hay mayor similitud. Entonces el ACJ genera como se puede apreciar en el gráfico agrupaciones de datos de acuerdo a su correlación, los cuales se pueden identificar fácilmente por un resultado coloreado.

El análisis de componentes principales de la figura 4.1.A. arrojó como sumatoria de los componentes 1 y 2 un porcentaje de 95%, indicando con ello que estos dos componentes fueron suficientes para explicar el modelo. Además se observan, dentro de las agrupaciones definidas sub-grups de algunas muestras que pueden relacionarse con el sitio de colecta de las mismas.

Se halla un conjunto de todas las especies, a su vez se formaron 3 agrupaciones o clúster diferenciadas por la coloración, obtenidos en SIMCA desde el dendrograma (figura.4.1.B), los puntos cercanos entre sí indican, que las muestras sobre las que se hicieron las observaciones, tienen características similares en cuanto a las variables analizadas; de tal manera que dentro de los clúster fueron evidentes pequeños sub-grupos, como el que se observa en la parte inferior izquierda, todos estos especímenes son de la especie *L. bogotensis* y se colectaron en Samacá.

Por su parte, el espécimen **6A** tuvo que ser excluido debido a que resultó fuera de la elipse del 95% de confianza (definiéndose por tanto como un "outlier"), el valor de CCRL de **6A**, significativamente superior al resto de las muestras, podría explicar este resultado. La característica más relevante del grupo 1 obtenido en el dendrograma, es que todas sus muestras pertenecen a la zona de Usme. El grupo 2, se encuentra influenciado por el CCRL, mostrando valores altos de esta variable; esto resulta importante, porque en ese grupo se observan los

ejemplares **4, 5 y 6**, con las debidas accesiones cada 3 meses de los mismos, siendo **4A, 4B, 4C, 5A, 5B y 5C**, al igual que las muestras reslatadas en el grupo 1, se encuentran especimenes cuya característica principal fue el haber sido colectadas en Usme, a excepción de la muestra **23.** Los valores altos de capacidad antioxidante del grupo 2, se podrían llegar a relaiconar con compuestos de naturaleza polifenòlica, considerándose este grupo de metabolitos como mecanismos de defensa contra ataques, es posible inferir como una justificación potencial que el alto CFT en las muestras **17** y **23** se debió a la inclemencia del ambiente o a diferentes variables que hacen hostil el medio donde se desarrolla la planta, sin que sea la única variable responsable de este hecho, partiendo de que se trata de especies diferentes (D'Agostina, 2006). Y finalmente, el grupo 3 de forma general presenta una baja capacidad captadora de radicales libres. Dentro de los clúster formados, los valores para CFT y FL, oscilan de valores mínimos hasta los más elevados, por ejemplo, las muestras **1** y **21** del grupo 3 varían significativamente en su CFT, siendo alto para **21** y muy bajo para **1**; de la misma manera se evidenció en el grupo 1 que la muestra **39** tuvo un valor elevado para CFT y la muestra **3** uno bajo, respecto a la anterior.

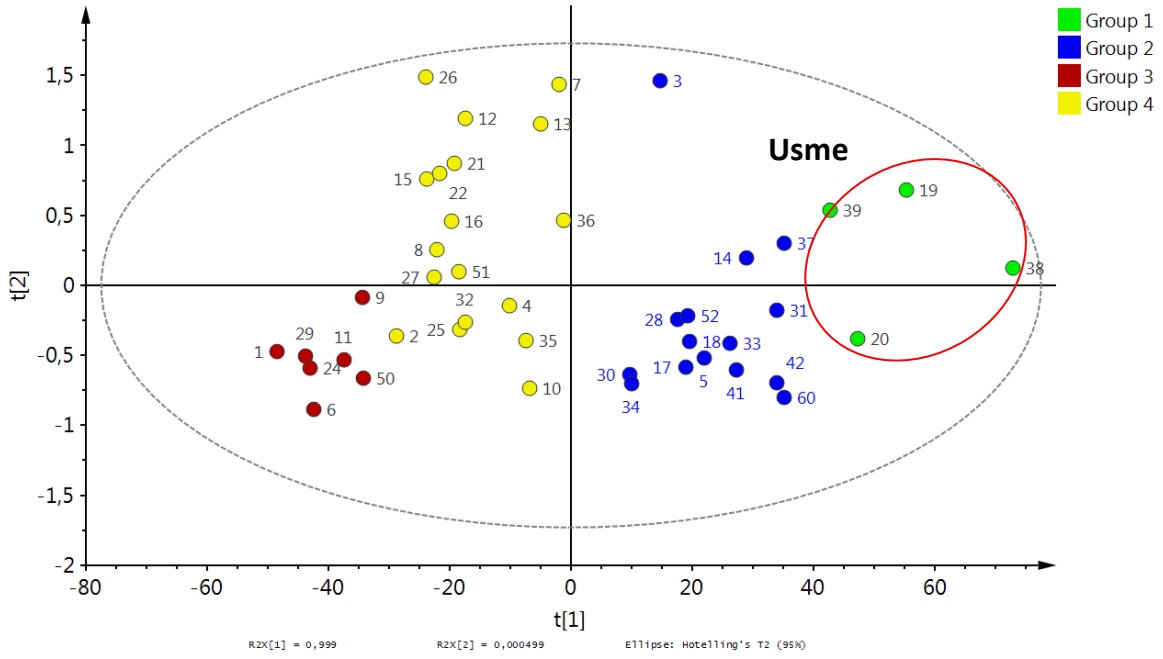


Figura 4.2. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4.

El análisis de componentes principales de la figura 4.2 arrojó como resultado de la sumatoria de los porcentajes de correlación del ACP 1 y ACP 2 un 99,9%, este valor tan alto indica un muy buen ajuste al modelo matemático, evidenciándose una vez más que no se necesitan más de los dos primeros componentes principales para establecer correlación entre los datos analizados. Vale destacar, que este ajuste se logró tras la eliminación de la muestra **23** del conjunto de datos, al resultar esta en un outlier, debido a un valor atípicamente elevado de fenoles y capacidad antioxidante, además de una considerable concentración de flavonoides. El ACJ se halla en la figura 4.1 de anexos.

Sobre el cuadrante I se encuentran localizadas tres muestras tomadas de un mismo lugar de colecta, las cuales por el análisis de conglomerados fueron agrupadas en un mismo clúster (grupo 1) y presentan los mayores resultados para CFT, FL y CCRL. En el grupo 2 y 4 se ubican las que presentan valores intermedios para las variables analizadas; en el cuadrante III se ubicó el grupo 3, con los valores más bajos de CFT, FL y CCRL. Algo importante por mencionar es que los grupos 2 y 4 cuentan con la presencia de varios especímenes de las especies *L. bogotensis* y *L. mirabilis*, pero la única relación hallada fue su especie, ya que no convergen en fecha o lugar de colecta, como es el caso del grupo 1 colectado en Usme. Para los grupos 1 y 2 se ha encontrado como característica común, que se trata en su mayoría de especímenes colectados en Usme, con excepción de las muestras **28** y **31** que se obtuvieron en el municipio de Samacá.

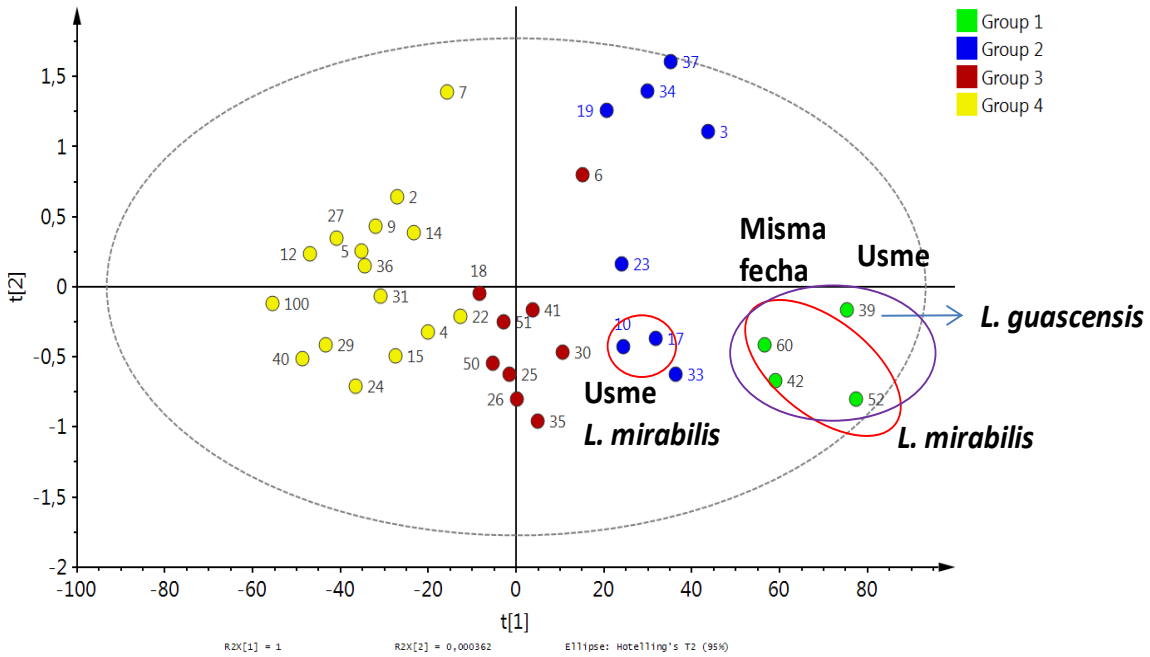


Figura 4.3. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4.

En este análisis los dos componentes principales explicaron el 99,9% de la variabilidad para las muestras de flores de lupino. Mediante el ACJ (figura 4.2 de anexos) se clasificaron los datos en 4 grupos. Las muestras **8** y **20** no corresponden a un patrón de comportamiento definido por el resto de las muestras, de tal manera que fueron previamente sustraídas por incumplir con el ajuste del módelo. En el grupo 4 se ubicaron los especímenes que presentan valores altos de CCRL; mientras que los pertenecientes al grupo 2 y 3, presentaron la tendencia a ubicarse en valores medios para la capacidad captadora de radicales libres, finalmente se tiene el clúster 1 con los valores bajos, determinados así por el método DPPH. En el cuadrante I hay prevalencia de los especímenes colectados en Usme pertenecientes a la especie *L. guascensis.*

Para el ACP de flores se mantiene la tendencia a encontrarse muy cercanos ciertos especímenes que comparten especie o lugar de colecta, para mayor claridad se han señalado con un óvalo, siendo así, se tienen en el grupo 1 las muestras **4C**, **5C**, **6A** y **39** colectadas en Usme;

en el grupo 2 se observan dos sub-grupos diferenciados según su CFT, el primero ubicado en el cuadrante I y el segundo en el cuadrante IV, con alto y bajo CFT, respectivamente. En el tercer grupo se encuentran especímenes de *L. mirabilis* y *L. bogotensis*, clasificandose dentro de este la muestra **6** como dato atípico, pues presenta valores altos en CFT y FL que no concuerdan con la tendencia de este grupo en particular.

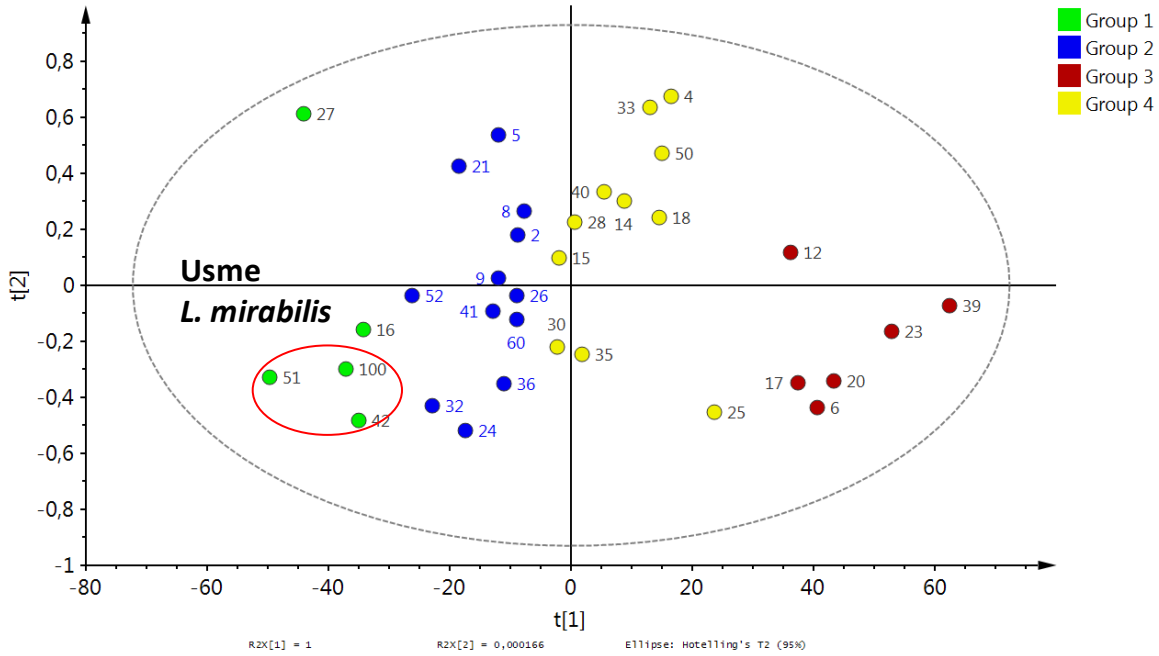


Figura 4.4. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4.

El ACP de la figura 4.4 explica el 99.9% de la variabilidad para vainas de lupino. El ACJ (figura 4.3 de anexos), por su parte, permitió la identificación de cuatro grupos de muestras, que concuerdan con el ACP (Figura 4.4). Cabe destacar, que este ajuste se logró tras la eliminación de las muestras **22**, **29**, **31** y **37** del conjunto de datos, al resultar estas en outliers, debido a un valor atípicamente elevado de fenoles, bajo y altos en capacidad antioxidante, respectivamente. Por otra parte, el grupo 1 presenta especímenes que en general muestran tendencia a valores bajos para la capacidad captadora de radicales libres, tendiendo como dato atípico el espécimen

27, ya que además exhibe un alto contenido de fenoles totales, y a medida que se desplaza a la izquierda del diagrama, esta condición va aumentados así como el CFT; finalmente el grupo 4 muestra los valores similares a los del grupo 2 para la capacidad antioxidante, con diferencia en cuanto a su menor CFT hasta llegar al grupo 3 en el cuadrante IV. Estos resultados no se ven relacionados por el lugar de recolección y tampoco por la especie, actuando en este caso otro posible tipo de variables que afectan la producción de cierto tipo de metabolito, específicamente los cuantificados; dichas variables pueden ser: edad de la planta, radiación adecuada, competencia de otras plantas por sustrato, entre otras.

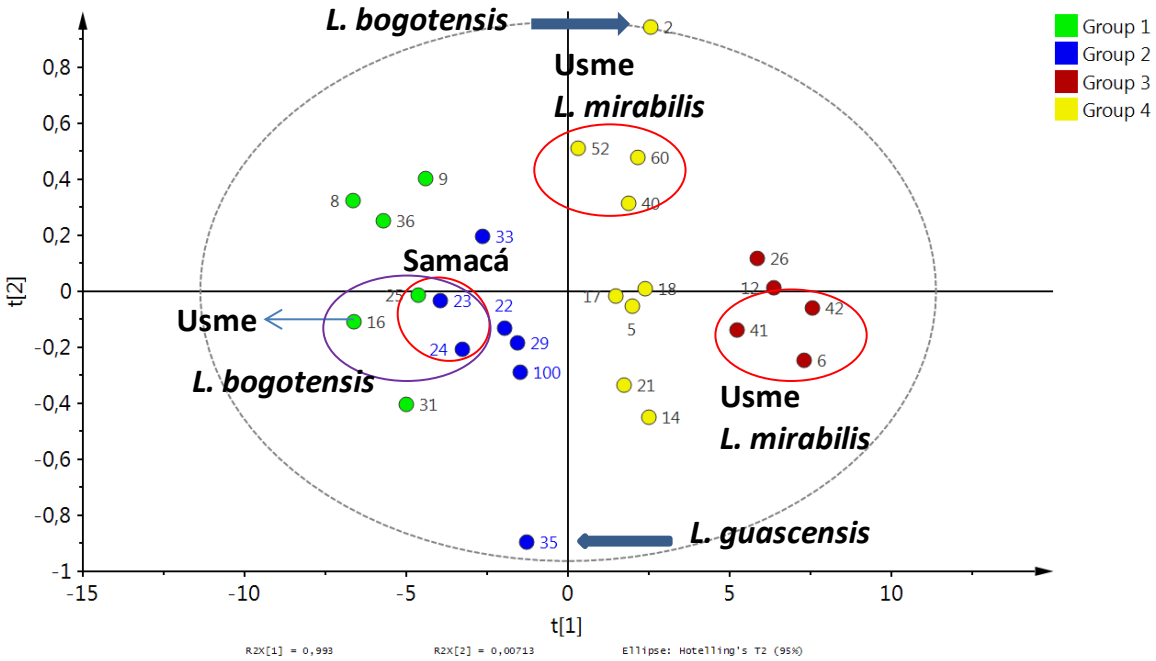


Figura 4.5. Análisis de componentes principales (ACP) con la caracterización química de los extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4.

La variabilidad mostrada para semillas de lupino es explicada en un 99.3% por los dos primeros componentes principales del modelo. El análisis de agrupamiento jerárquico (figura 4.4. de anexos) permitió clasificar las muestras en 4 grupos; previamente fue necesario suprimir las muestras **4** (*L. mirabilis*) con un valor elevado para CCRL, y **15** (*L. bogotensis*) con el

comportamiento opuesto, para así ajustar las muestras que sí cumplen con el módelo. En los grupos 1 y 2 se reflejaron los datos de menor valor respecto a la capacidad antioxidante, mientras que en los grupos 2 y 4 presentan valores elevados de CCRL, en todos los grupos el CFT y FL es variado. Se resaltan las siguientes muestras por distar significativamente con el comportamiento de las demás, siendo estas, **2** (*L. bogotensis*) y **35** (*L. guascensis*) los cuales presentan una mayor y menor concentración de fenoles totales, respectivamente, ocasionando que se encuentren justo en el límite del diagrama.

Barros y colaboradores (2010), realizaron un estudio químico comparativo entre hojas, tallos, flores y frutos inmaduros de *Malca sylvestris*, reportaron que la composición química depende de la parte de la planta. Esto, debido a que cada órgano puede ser alterado de diferente manera por el entorno. Las hojas por encontrarse en la zona aerea de la planta y ser el principal órgano fotosintético, deben defenderse de los cambios bruscos en la radiación, el aumento o disminución en la precipitación, depredación de los animales, entre otros, por lo cual se espera que muestre características diferentes a los demás órganos, esto podrá ser evidendiado con el posterior análisis de MCPO-AD.

4.3.2. Análisis multivariado de la totalidad de perfiles cromatográficos

4.3.2.1. MCPO-AD total

Fue realizado el módelo de mínimos cuadrados parciales ortogonales con análisis discriminante, es decir, un MCPO-AD; se usó como variable discriminante el órgano de la planta, de tal manera que se emplearon los perfiles cromatográficos de todos los extractos. La regresión MCPO-AD ofrece una mejor visualización de los coeficientes y las cargas, al realizar el filtro ortogonal, permite identificar las partes responsables de la variación y correlación. Este método se convirtió en uno de los procedimientos quimiométricos más populares en metabolómica principalmente por su desarrollo visual, ya que, ofrece un pseudo espectro en escala de colores, en él los coeficientes de las MCPO se asocian con un color para determinar la correlación de las variables discriminantes (Bylesjo y otro, 2006).

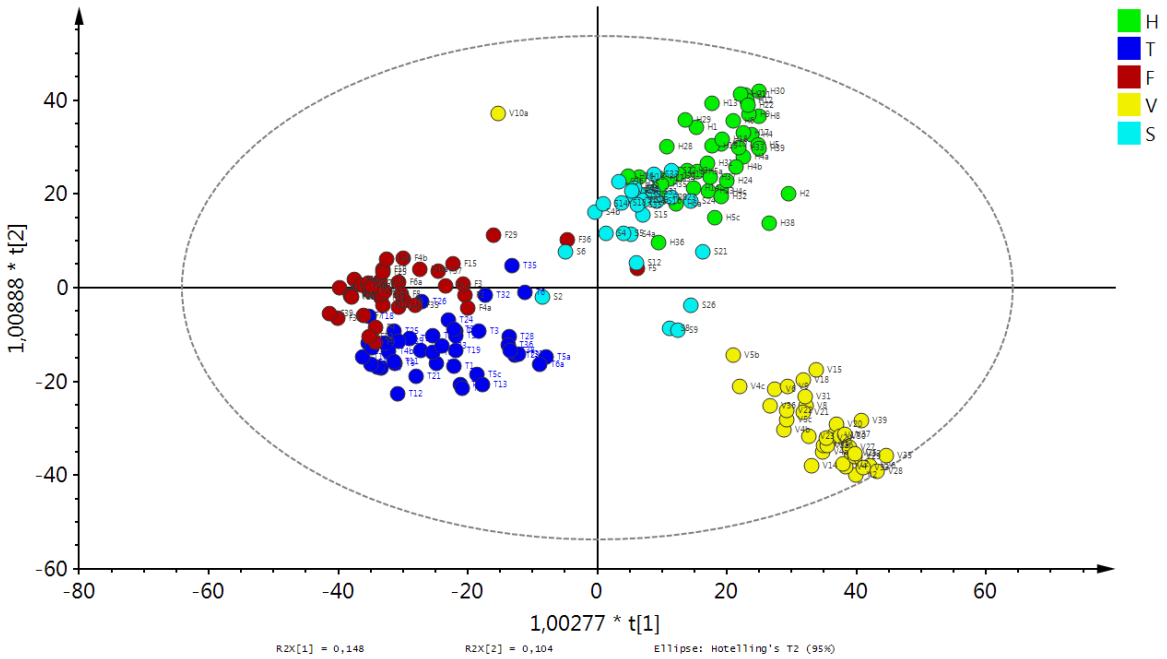


Figura 4.6. MCPO con análisis discriminante según el órgano de la planta. H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas.

El componente ortogonal 1 (CO1) explicó el 14,8 % de la varianza total y CO2 explicó el 10,4 %. Es así que el gráfico de la figura 4.6 explica tan sólo el 25,2 % de la variabilidad en los datos correspondientes que tiene como criterio de clasificación el órgano de la planta (hojas, tallos, flores, vainas y semillas); sin embargo, es evidente la separación de la mayoría de los perfiles según la parte de la planta a la que pertenecen. Se observa además que las hojas y semillas comparten cierta similitud a nivel de perfiles cromatográficos, así como los tallos y las flores, mientras que las vainas se discriminaron con relación a las otras partes, cabe resaltar que dentro de las vainas se halló un dato atípico a todas las muestras correspondiente al especimen **10A** de este òrgano. Es así, que la regresión por MCPO-AD muestra que existe una distinción entre partes, aunque se debe tener en cuenta que el análisis total de las muestras fue realizado sobre 5 especies diferentes de *Lupinus,* es decir, la diferencia significativa entre los perfiles cromatográficos para ciertas partes de las plantas se mantuvo a través de todas las especies estudiadas (es decir, la diferencia significativa entre los perfiles cromatogràficos para ciertas partes de la planta se mantuvo a través de todas las especies estudiadas). Lo observado se halla acorde a lo observado en el capitulo anterior y respaldado por Sawi (2007), quien en su

publicación mostró diferencias en los componentes de hojas, flores y frutos, así como en la capacidad de captar radicales libres en cada uno de estos órganos, y tal como se había delineado en el análisis visual de los perfiles en la sección 3.3.2.

Con el fin de evaluar diferencias entre cada órgano respecto a los datos obtenidos de los perfiles cromatogràficos, se hace necesaria la utilización de un ACP por cada no de ellos y así contrastar con lo observado en la figura 4.6.

4.3.3. Análisis multivariado con perfiles cromatográficos

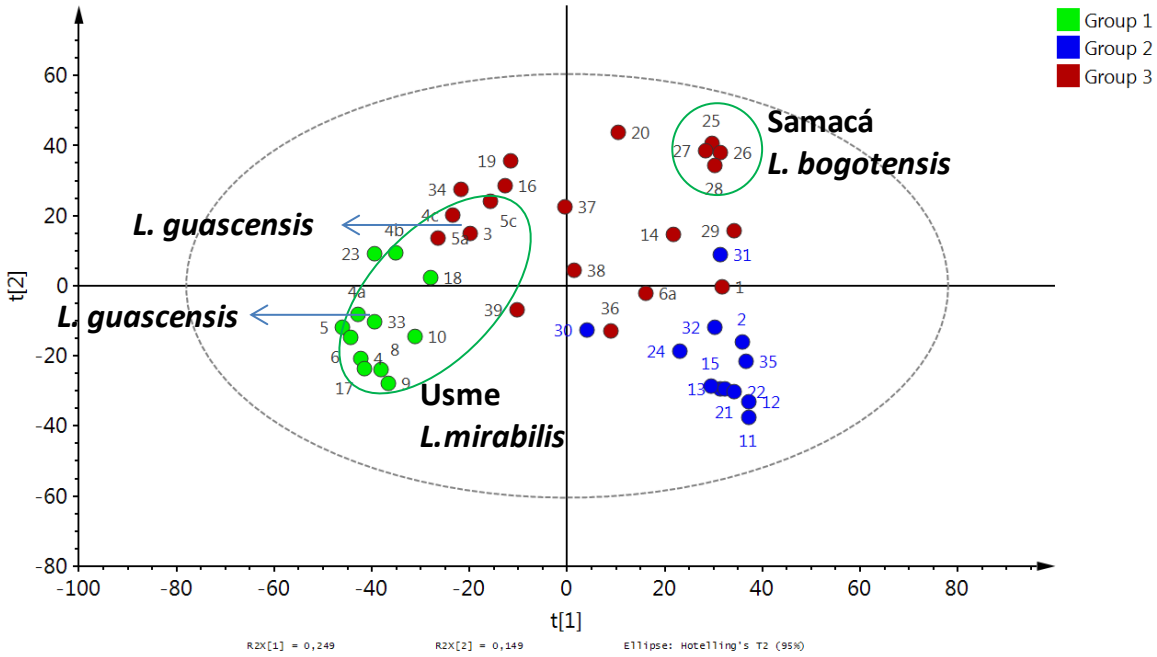


Figura 4.7. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

Los datos del análisis multivariado de la figura 4.7 sobre los extractos de hojas, indican que el componente principal 1 (CP1) explicó hasta 24,9 % de la varianza total y CP2 explicó el 14,9 %. Así, el gráfico explicó un total del 39,8 % de la variabilidad en los datos de extractos de hojas. El análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 4.5 de anexos) sugirió 3 grupos; el grupo 1 y parte

del 3 de la especie *L.mirabilis*, fueron resaltados por proceder de la zona de Usme. Del lado positivo de la elipse fue clara la dispersión de las muestras; en el grupo 3 se observó un pequeño sub-grupo compuesto por cuatro especímenes de *L. bogotensis* colectados en Samacá, estos especímenes han mostrado relación de similitud desde su CFT, FL y CCRL (figura 2.2.), ahora se hacen evidentes sus diferencias mínimas a través de los perfiles cromatográficos; finalmente el grupo 2 se caracterizó por una prevalencia de la especie *L. bogotensis* colectadas tanto en Boyacá como Cundinamarca.

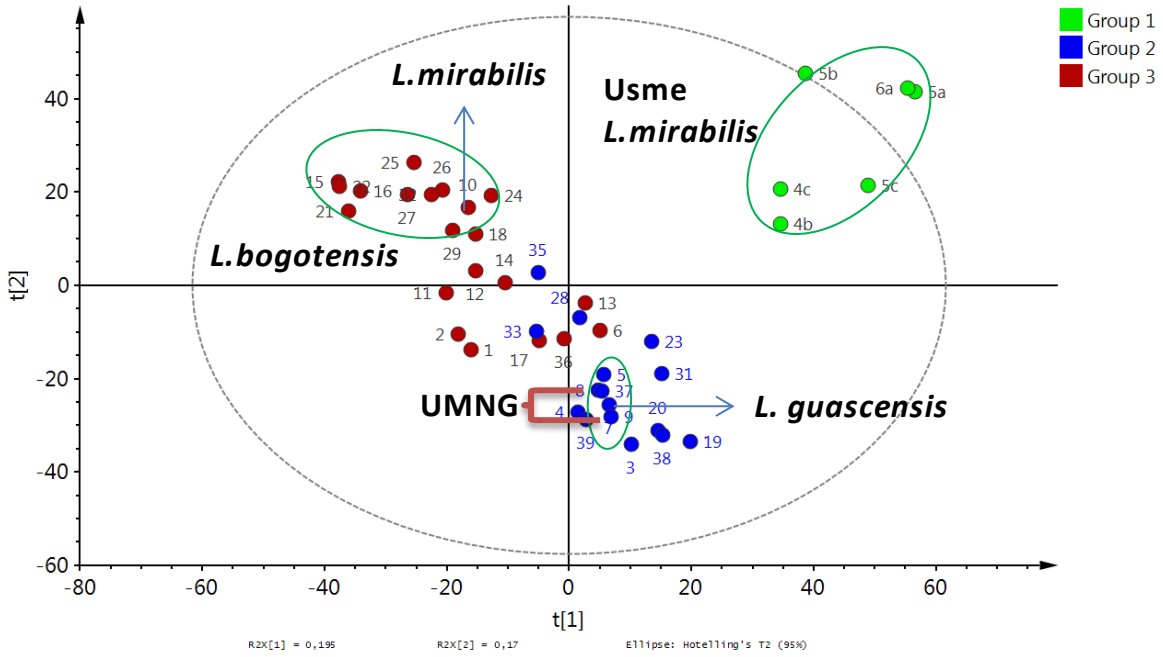


Figura 4.8. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

El análisis de componentes principales de tallos de *Lupinus* explicó un 36,5% de la variabilidad de los datos, con un primer componente principal (CP1) de 19,5% y un CP2 de 17%. El ACJ permitió la distinción de tres grandes agrupaciones. Se observa el grupo 1 completamente separado de los demás, conformado por seis especímenes de la especie *L. mirabilis*, los cuales fueron colectados cerca al embalse del Hato, de los cuales tres de ellos (**5A**,

5B y **6A**) se salen de la elipse de confianza; sin embargo son dejados en el análisis debido a que muestran un comportamiento similar al presentado por las demás muestras de su especie, según el test de Tukey, exhiben una correlación entre las tres variables evaluadas (CFT, FL y CCRL), lo cual concuerda con los resultados observados en la figura 4.8. Se encuentra señalada una parte del grupo 2, donde se hallan especies de *L. mirabilis* colectadas en Cajicá (sede campus UMNG) y del municipio de Chisacá; los especímenes señalados del tercer grupo, por su parte, son de la especie *L. bogotensis*, exceptuando las muestras **10** y **18** que corresponden a la especie *L. mirabilis.*

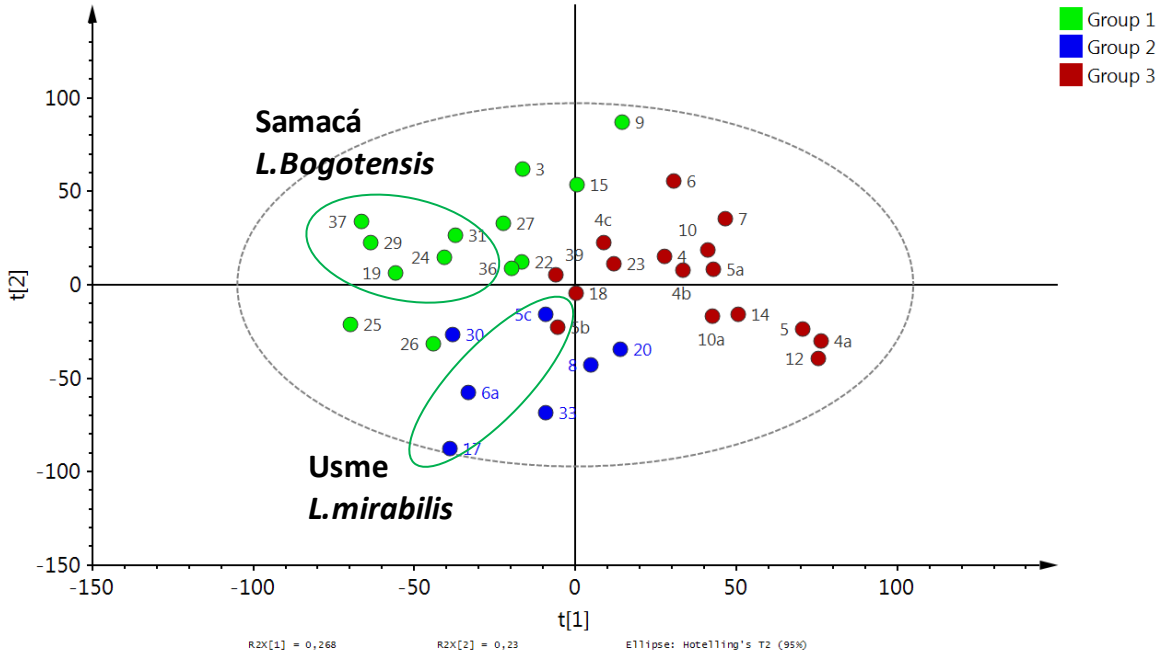


Figura 4.9. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.

La figura 4.9 con el ACP con el perfilado cromatográfico de los extractos de flores de cinco especies de *Lupinus* explicó un 49,8% de la variabilidad total de los datos. Con el ACJ se ha clasificado la serie de datos en 3 grupos, este se encuentra en anexos (figura 4.7). Se han señalado algunos grupos, en ellos se evidenció cercanía entre especímenes pertenecientes a la

misma especie; es el caso del grupo 1 con la especie *L. bogotensis* que fue colectada en Samacá. En el grupo 2, sobresalen especímenes de *L. mirabilis* colectados en la zona de Usme. En lo que se refiere al grupo 3, se ha visualizado que en su mayoría las muestras son de la especie *L.mirabilis*. Los datos estadísticos de los extractos de flores resultan bastante dispersos, al ser contrastados con los resultados arrojados por la prueba de Tukey (capítulo 2), se puede inferir que efectivamente las variables evaluadas no presentan una estrecha relación entre ellas; tal es el caso de la muestra **8**, la cual exhibe valores elevados en el CFT y CCRL, sin embargo su FL es bajo, lo que podría indicar que la capacidad captadora de radicales puede estar condicionada por otro tipo de compuesto fenólico no flavonoide; siendo este un comportamiento usual para la mayoría de extractos de flores; esta característica junto con la prueba de Tukey son un indicativo de que evidentemente las tres variables de estudio no se interrelacionan de forma directa para este órgano de la planta.

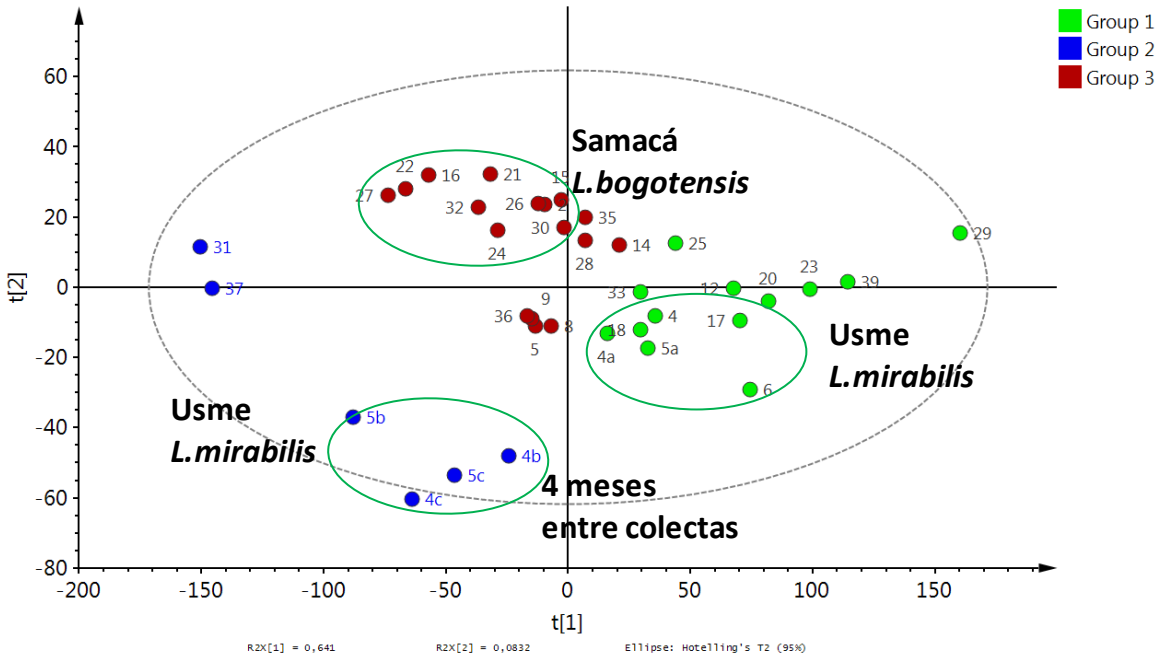


Figura 4.10. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.

El ACP mostrado en la figura 4.10, explicó un 72,42% de la variabilidad de los datos para los extractos de vainas (CP1=64,1% y CP2=8,32%). Con ayuda del ACJ (Figura 4.9 en anexos) se generaron tres agrupaciones según los correspondientes perfiles cromatográficos. A pesar de encontrarse estos datos mucho más dispersos que para el caso de flores, se logró la señalización de grupos de muestras caracterizados por pertenecer a la misma especie y compartir lugar de colecta; el grupo 1 se encuentra conformado por seis especímenes pertenecientes a la especie *L. mirabilis*, colectados en el embalse del Hato, en el cual se encuentran las muestras **4**, **4A**, **5A** y **6**, caracterizadas por tener más de una colecta y presentar un comportamiento estadísticamente similar; bajo el mismo criterio fueron señaladas en el grupo 2 las muestras **4B, 4C, 5B y 5C**, cuya característica fue pertenecer a la tercera y cuarta colecta de los especímenes **4** y **5**, y al igual que lo dicho en el grupo 1, presentar un comportamiento similar, lo que hace que generalmente se encuentren muy cercanas en todos los análisis; finalmente, el grupo 3 se encuentra conformado en su mayoría por especímenes de *L. bogotensis*, así como por tres muestras pertenecientes a la especie *L. mirabilis.*

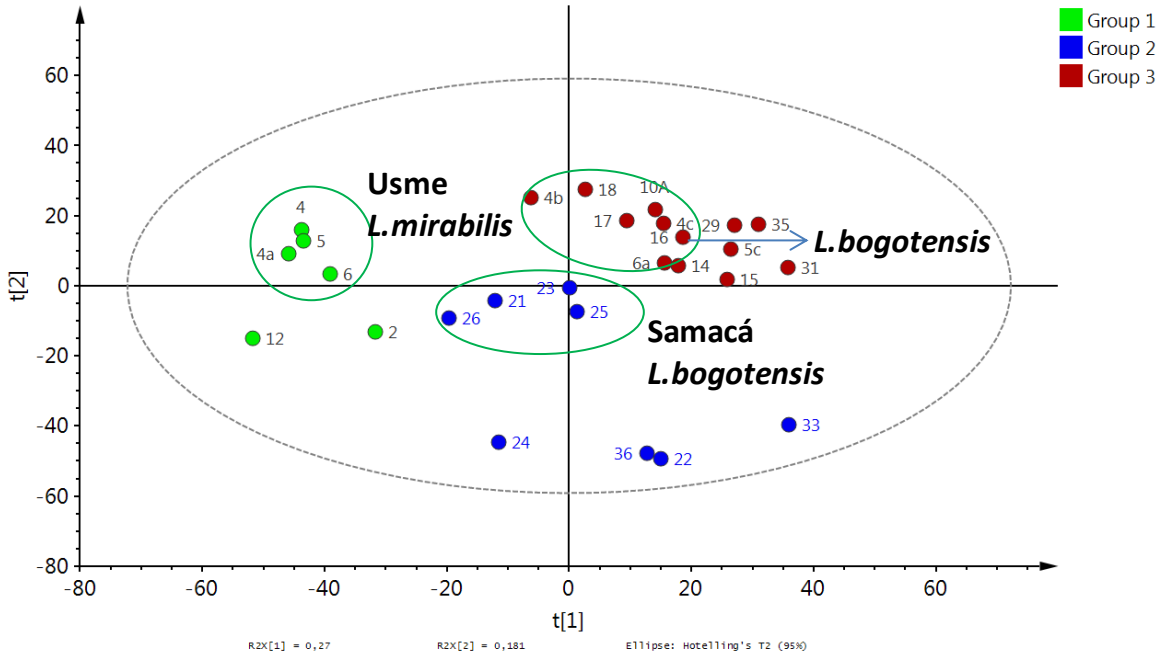


Figura 4.11. Análisis de componentes principales (ACP) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus* (Score scatter plot). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3.

El ACP de la figura 4.11 de los extractos de semillas explicó un 45,1% de la variabilidad de los datos CP1=27% y CP2=18,1%. Con el ACJ de la figura 4,10 en anexos se definieron 3 clústers; siendo necesario excluir las muestras **8** y **9** por salirse de la elipse de confianza. Contrario a lo mostrado por flores y vainas, en semillas se presenta menor dispersión de datos para la mayoría de muestras, localizándose en el cuadrante II un conjunto de especímenes del grupo 1, caracterizados por pertenecer a la especie *L. mirabilis* localizados en Usme, con excepción de las muestras **2** (*L. bogotensis*) y **12** (*L. pubescens*), cuyos componentes distan de la característica del grupo. Por su parte, el grupo 2 se encuentra mucho más disperso que el grupo anterior, observándose un sub-grupo de la especie *L. bogotensis* colectados en Samacá en la misma fecha **21**, **23**, **25** y **26**; las muestras **22, 24, 33 y 36** por su parte, pese a encontrarse en el grupo 2 se evidencian distantes y por ello se presume que sus componentes químicos varían en comparación con el sub-grupo señalado en la figura 4.11. El grupo 3 se discriminó notablemente respecto a los otros, caracterizado por la presencia de muestras de *L. mirabilis* y haber sido colectadas en la misma zona geográfica en marzo de 2014, ya que como se aprecia en la figura 3.7 (capítulo 3) las muestras de esta especie presentan un patrón de comportamiento similar en sus componentes químicos.

A pesar de que se pudo formular ciertas relaciones para el comportamiento de algunos individuos, la gran dispersión de los datos dificultó identificar con seguridad las causas de la variabilidad metabólica presentada por este órgano. Lo anterior valida la existencia de diferencias en el metaboloma, indistintamente de la especie o sitio de colecta, así como de la parte de un mismo especímen.

4.3.4. Análisis supervisado

Partiendo de lo anterior se realizò un análisis supervisado empleando como variable de supervisión CFT, con el fin de establecer relaciones entre cada órgano de todas las muestras, indistintamente de su especie o zona de colecta, realizandose el debido loading line para las matrices de muestras que mantivueron linealidad y el módelo fue efectivo.

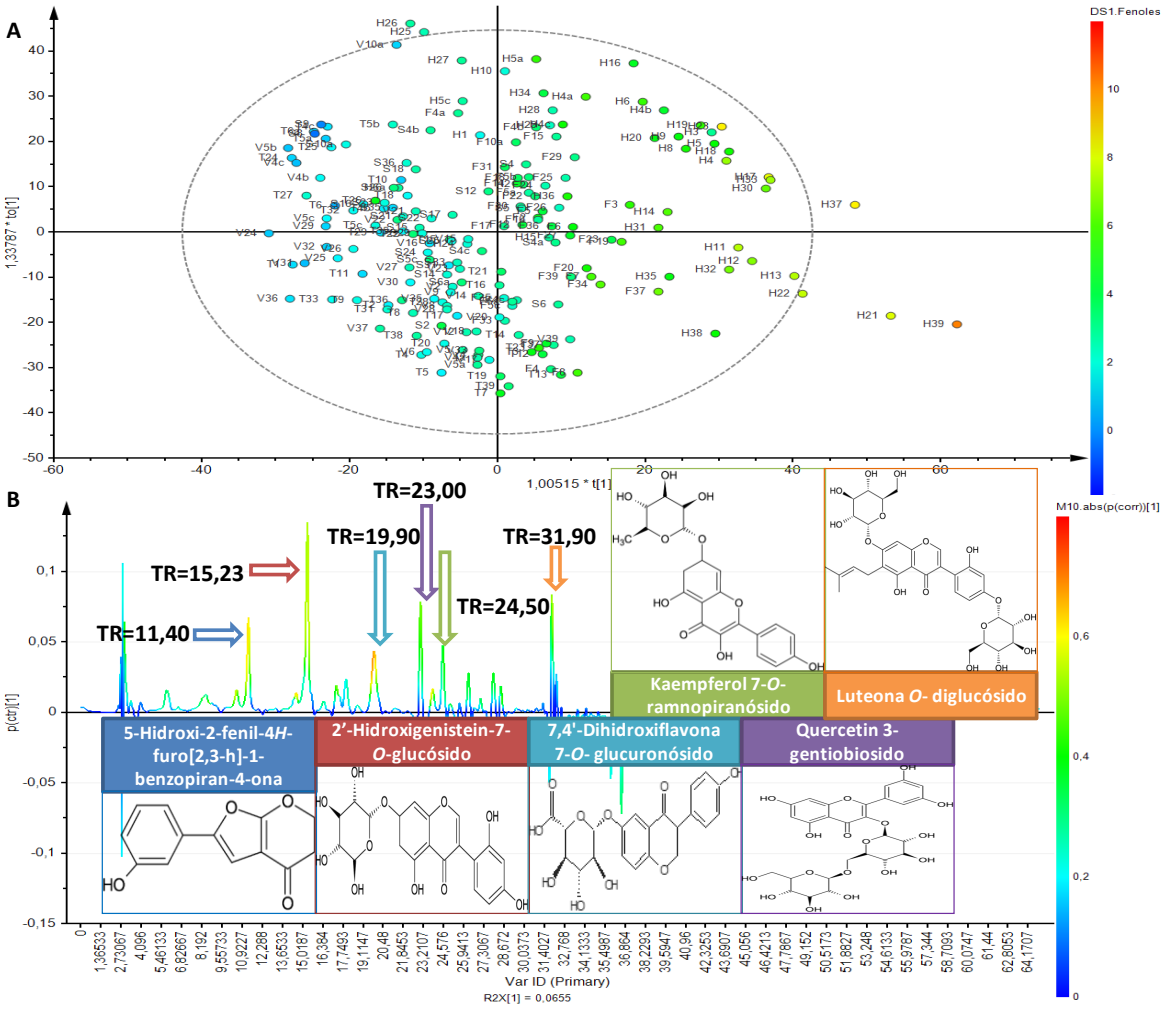


Figura 4.12. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales OPLS de extractos de Hojas de *Lupinus*, supervisado por el contenido de fenoles (A) Score scatter plot y (B) S-line

En la figura 4.12 se construyó el score-plot con los datos de los perfiles cromatográficos, siendo supervisados con el método cuantitativo de fenoles totales para las muestras estudiadas del género *Lupinus*. En este se observa una clara tendencia a presentar valores de bajo CFT, teniendo concentraciones altas de fenoles a la derecha de la figura, encontrándose muestras como la **H39**, por fuera del límite de confianza, presentando el valor más alto de CFT, así mismo, los especímenes **H25** y **H26** también por fuera de la elipse, lo que denota una clara variabilidad respecto a la presencia de estos metabolitos entre las muestras estudiadas, de otro lado, se observa la tendencia a presentar cierta distribución de acuerdo a la parte de la planta, teniendo en un principio hacia la derecha las hojas y a la izquierda a vainas, mostrando con ello que pese a existir una evidente variabilidad metabólica, los órganos exhiben cierto patrón de

comportamiento que posibilitaría la predicción del comportamiento metabólico. En el S-line, es posible observar seis picos mayoritarios que aportan de manera positiva a CFT, siendo estos 4, 5, 7, 8, 9 y 14, lo cual tiene sentido, ya que se trata de flavonoides y por estructura es posible observar que al presentar grupos OH, tienen la capacidad de donar ese protón y neutralizar la carga de los radicales libres, siendo esta una característica importante de los compuestos fenólicos. El TR=: 15,23 min, correspondiente a 2'-hidroxigenistein-7-*O*-glucósido por Durango (2012) debido a se ha reconocido que la resistencia de las plantas resulta, en buena medida, de la acumulación oportuna de las fitoalexinas en concentraciones suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno, así como el ser un compuesto que contribuye enormemente en la capacidad inmunomoduladora, antitumoral, antiinflamatoria, antioxidante, entre otras

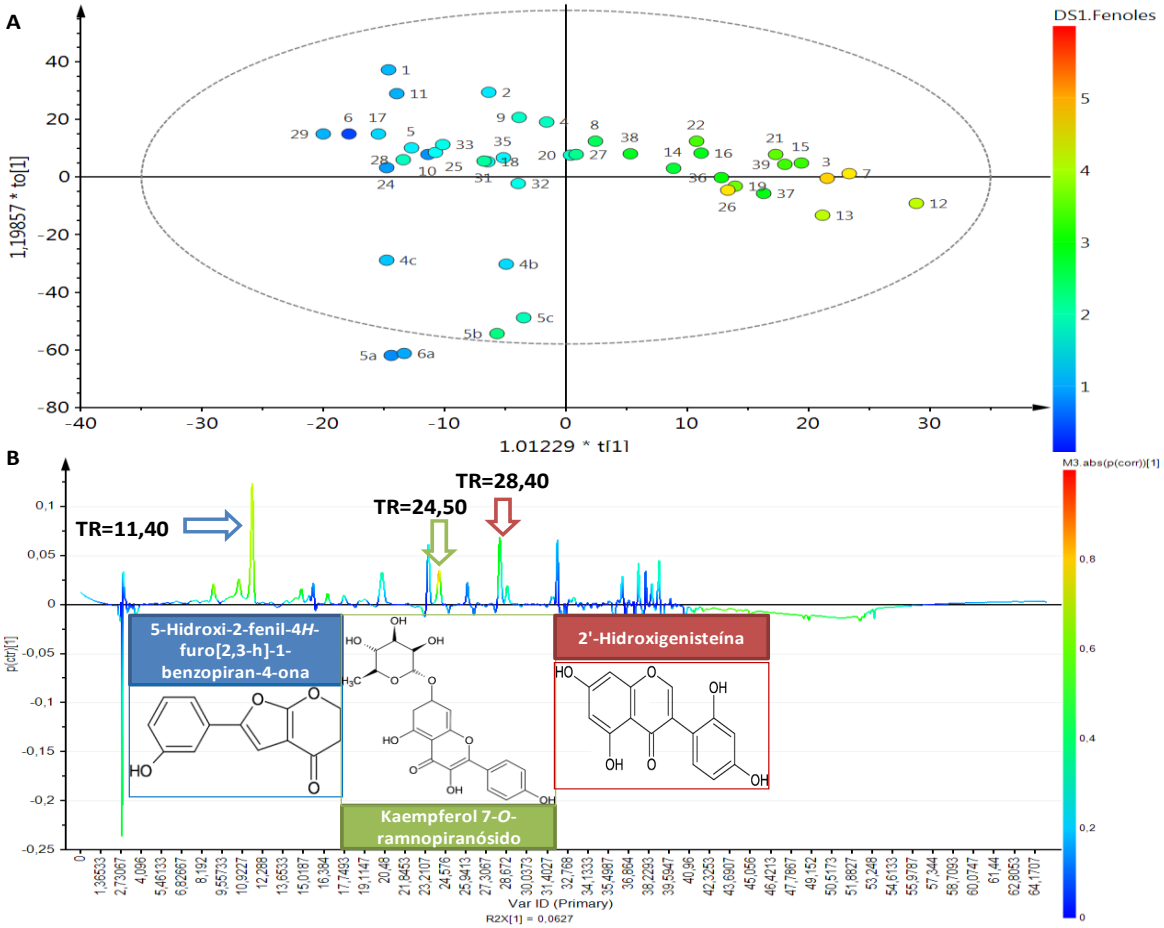


Figura 4.13. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales OPLS de extractos de tallos de *Lupinus*, supervisado por el contenido de fenoles (A) Score scatter plot y (B) S-line

A manera de comparación, se presenta el score plot de tallos de *Lupinus* en la figura 4.13.A, donde se observa un comportamiento lineal de los datos, al igual que en el análisis anterior se

evidenció la tendencia de bajo a alto CFT de izquierda a derecha, mostrando un comportamiento atípico en los especímenes **4B**, **4C**, **5A**, **5B**, **5C** y **6A**, de *L. mirabilis*, los cuales se salen de dicha linealidad, encontrándose **5A** y **6A**, por fuera de la elipse de confianza; estass seis muestras particularmente, en análisis anteriores han exhibido comportamientos similares respecto a las variables analizadas, lo cual conlleva a pensar que al ser obtenidas de plantas ubicadas en zonas muy cercanas, su comportamiento metabólico resulta también similar. El S-line, permite observar tres picos que aportan de manera positiva al CFT 4, 9 y 13, los dos primeros son comunes con los presentados en la figura 4.12.B, cuyas estructuras confirman la capacidad que tienen dichos compuestos de atrapar radicales libres. Partiendo de los resultados arrojados por la figura 4.13.B, es posible establecer que aquellas muestras que se localizan a la derecha del Score plot, presentan alto contenido de fenoles, por tener alta concentración de los compuestos señalados.

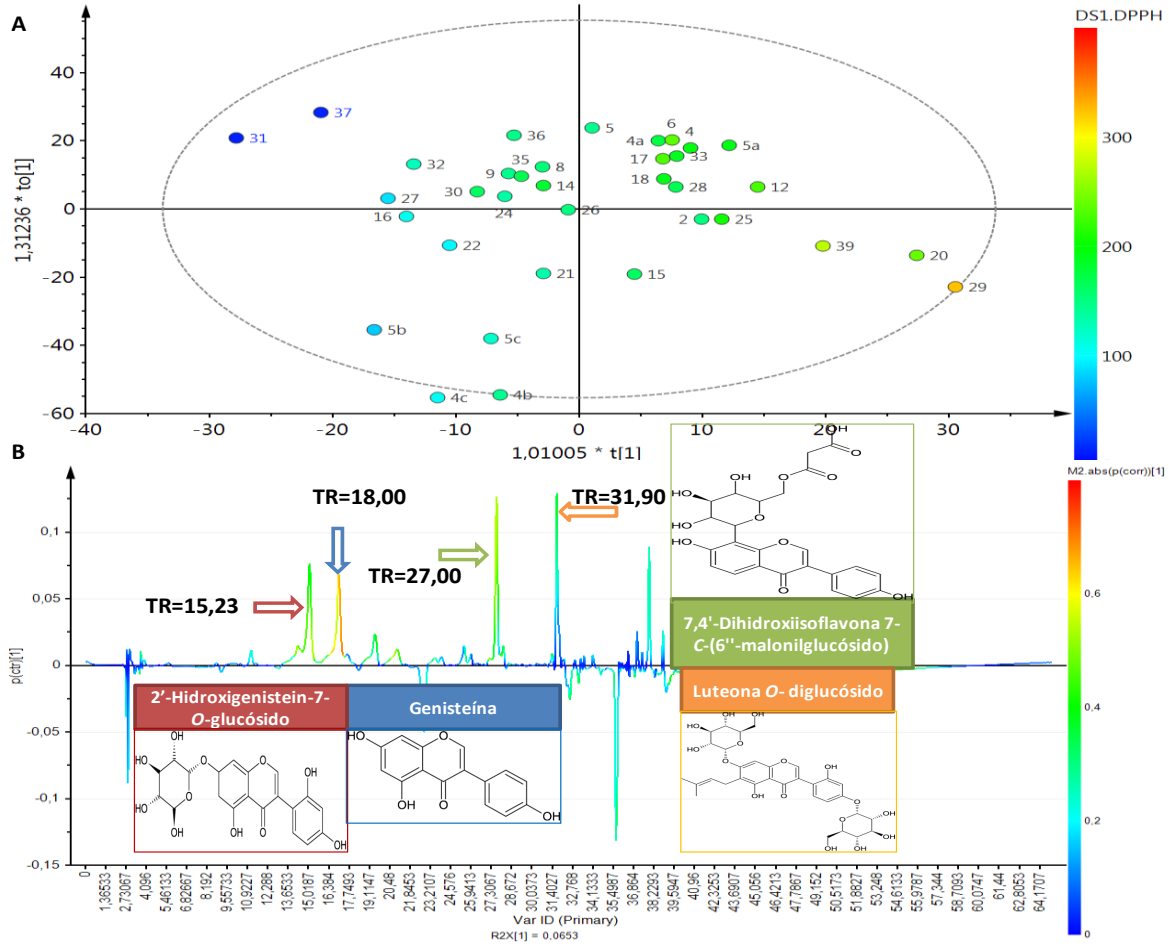


Figura 4.14. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales de extractos de vainas de *Lupinus,* supervisado la capacidad captadora de radicales libres (A) Score scatter plot y (B) S-line.

En los score plot de la figura. 4.14 se observa una relativa linealidad de los datos, con la tendencia de poder antioxidante bajo a alto de izquierda a derecha en el score plot, presentando por lo tanto mejores antioxidantes ubicados a la derecha la elipse, por su parte las muestras correspondientes a la segunda y tercera colecta de los especímenes **4** y **5**, continúan con un comportamiento similar ubicándose en el cuadrante III del gráfico. A partir del S-line, fue posible la identificación de cuatro picos mayoritarios 5, 6, 11 y 14, que serían en principio, los mayores responsables del desarrollo de esta capacidad en vainas de las muestras colectadas. De estos, 5 y 14, han sido mencionados anteriormente por aportar en gran medida en CFT para la mayoría de muestras. Como el compuesto que más aporta al módelo supervisado con CCRL se encontró en el tiempo de retención 18,00 min la genisteína, esta isoflavona ha sido considerada muy importante dentro de las mismas por su considerable actividad antioxidante (Challem, 2010).

4.4. CONCLUSIONES

El estudio de las cinco especies del género *Lupinus,* evidenció el amplio perfil metabólico con el que cuenta dicho género, posibilitando así el estudio de moléculas biológicamente activas. La importancia de este estudio donde se relacionaron los resultados a partir de los datos cuantitativos obtenidos por espectrofotometría (CFT, FL y CCRL) y cualitativos (CLAE y CLAE-EM), junto con las técnicas analíticas empleadas, permitió establecer patrones de comportamiento del metabolismo de los especímenes en respuesta a estímulos generados por el ambiente a través de herramientas quimiometricas diversas. Estos estímulos, junto con el análisis químico, las condiciones de la planta, así como sus perfiles cromatográficos fueron evaluados para establecer el perfil metabolómico de las especies estudiadas del género *Lupinus.*

El ACP permitió la reducción de la matriz de datos formada por diversas variables, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando con ello la interpretación de lo datos (Saporta, 2011). Este análisis arrojó un diagrama de puntos, caracterizando cada muestra en grupos definidos por colores diferentes, donde, en el grupo 1 fueron ubicados aquellos especímenes que en general

cuentan con altos valores para CFT, CF así como de CCLR. El análisis multivariado individual de los perfiles cromatográficos en géneral reflejó que al igual que en el ACP con datos cuantitativos, la formación de ciertos subgrupos por lugar de colecta, encontrándose así muestras una constante convergencia entre accesiones provenientes de Usme, en su mayoría pertenecientes a la especie *L. mirabilis*; así como de *L.bogotensis* colectadas en Samacá. Estos resultados mostraron una distribución dispersa de los datos, que aún así, permitió establecer para cada órgano de la planta, nuevos grupos de muestras relacionadas por proceder de una misma zona o igual fecha de muestreo, estos sub-grupos sin embargo, no incluyeron a todas las muestras o por lo menos a la mayoría de ellas, por lo que no es un resultado contundente que permita aseverar una relación entre el comportamiento metabolico de cada individuo, frente al lugar de muestreo, así como por la especie a la que pertenece.

El MCPO-AD, por su parte, mostró un comportamiento similar en ciertos órganos de la planta, encontrándose relacionadas hojas y semillas, así como tallos y flores. Se observó cómo cada órgano se comporta de manera diferente, este comportamiento se ve directamente influenciado por las condiciones ambientales a las cuales está sometida la planta, ya que de este estrés depende la producción de cada metabolito.

El método supervisado es una herramienta de gran ayuda que emplea la información de los datos para encontrar la mejor varianza que los separa, esto partiendo del hecho que el ACP modela la variación más grande en los datos, pero la separación de estos no reside necesariamente en las mismas dimensiones con la mayor dimensión, por lo tanto ACP puede no mostrar suficiente discriminación, por ello y dependiendo del interés del investigador por realizar análisis minuciosos, resulta importante el empleo de nuevas herramientas de análisis multivariado que posibiliten un estudio detallado de los datos y permitan acercarse cada vez más al objetivo propuesto en la investigación.

4.5. REFERENCIAS

- Ávalos, A., y Pérez, H. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Departamento de biología vegetal (Fisiología vegetal). Facultad de biología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

- Barros, L., Carvalho, A., Ferreira, I. (2010). Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of Malva sylvestris: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 1466-1472.
- Beltrán, A., y Yanes, O.(2012). Metabolómica: nuevo paradigma para el estudio de sistemas biológicos. *GRASEQA*, 5-10.
- Bylesjo, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J., Holmes, E., y Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, *20*, 341–351.
- Cardona, D., Castaño, E., Saldarriaga, N., Quiñones, W., (2003). Aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) en el análisis de medicamentos, Revista Vitae, vol 10, núm 2, Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia, pp 80-88
- Challem, J. (2010). Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, alzheimer y enfermedades cardiovasculares. Ediciones Nowtilus S.L: España. p. 118
- D'Agostina, A., Boschin, G., Resta, D., (2006). Evolution of isoflavones during the growth of plants of *Lupinus albus*. Department of Agri-Food Molecular Sciences (DISMA), University of Milan, Milan, Italy.
- De la Fuente, S. (2011). Análisis de Conglomerados, Facultad de ciencias de la Universidad Nacional de México (UNAM), Trabajo de Doctorado.
- Durango, D., Quiñonez, W y Escobar, G. (2012). Salicilatos E Isonicotinatos: Inductores De Fitoalexinas En Variedades Colombianas De Frijol (*Phaseolus Vulgaris*). Abstract book of XXI Italo American congress of ethnomedicine. p 184.
- El-Sawi. (2007). Comparison between the chemical composition and radical scavenging activities of essential oils of leaves, flowers and fruits of Callistemon lanceolatus DC grown in Egypt. *Planta médica,* 73, 220.
- García Mier, L., Alonso Herrada, J., Torres Pacheco, I., Guevara González, R., y Cruz Hernández, A. (2012). Participación De Las Ciencias Analíticas Modernas (Genómica, Proteómica, Metabolómica) En El Estudio De Las Plantas. Ciencia@uaq, 5(*1*), 1-11.
- González, C., Vaamonde, A., Barreiro A. (2013). Tratamiento de datos con R, Statistica y SPSS. Ediciones Díaz de Santos: España. p. 759

- Kowalczuk, A., Lozak, A., Kiljan, M., Metrak, K., y Kordian, J. (2015). Application of chemometrics for identification of psychoactive plants. *Acta Poloniae Pharmaceutica, 72*(3), 517-525.
- López, E., Pérez, A., y Ramos, G. (2008). Modelos complementarios al Análisis Factorial en la construcción de escalas ordinales: un ejemplo aplicado a la medida del Clima Social Aula. *Revista de Educación*, 354, pp. 369-397
- Lucio, J.R. (2012). *Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Mancera, J., Garay, E., Campos, S. (2003). High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions, *PLoS Genetics, 10* (2), p 7.
- Nevedomskaya, E., Mayboroda, O., y Deelder, A. (2011). Cross-platform analysis of longitudinal data in metabolomics. *Mol. Biosyst*, 7, 3214-3222.
- Nielsen, N. V., Carstensen, J. M., Smedsgaard, J. (1998). Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography*, 805, 17-35.
- Patti, G., Yanes, O., Shriver, L., Courade, J., Tautenhahn, R., Manchester, M., y Siuzdak, G.(2012). Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nat. Chem. Bio*l, 8, 232-234.
- Ronowicz, J., Kupcewicz, B., y Budzisz, E. (2013). Chemometric analysis of antioxidant properties of herbal products containing *Ginkgo biloba* extract. *Central European Journal of Biology, 8(4),* 374-385.
- Saporta, Gilbert. (2011) Probabilities, Analyse de données et Statistique. Dunod
- Skov, T., van den Berg, F., Tomasi, G., Bro, R. (2006). Automated alignment of chromatographic data. *Journal of Chemometrics*, 20, 484-497.
- Térradez, M. (2012). Análisis de componentes principales, Fundació per a la Universitat Oberta de Catalunya. Barcelona. pp 5-8
- Valcárcel, J., Lucena, A. (2012). Relaciones sinérgicas entre la Química Analítica y los estándares escritos: contribución a la mejora continua de la calidad de vida, Metabolómica,

Boletín Graseqa, grupo regional andaluz sociedad Española de química analítica, ISSN: 2254-124, pp 7-23.

- Vázquez, L. (2011). *Tipificación y caracterización de café comercial mediante métodos instrumentales y quimiometría*. Tesis de maestría. Colegio de posgrados. Tabasco. p. 3.
- Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G., y Siuzdak,G. (2011). Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling . *Analytical Chemistry* , 83, 2152-2161.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se estudiaron en total 47 plantas, colectadas en diferentes lugares de Cundinamarca y Boyacá, Colombia, con entornos distintos. Se analizaron cinco órganos de la planta (hojas, tallos, flores, vainas y semillas) y se generó un perfil químico (cuantificación de fenoles y flavonoides totales y su capacidad de captarradicales libres), donde se encontró la capacidad antioxidante entendida como la capacidad de capturar radicales libres no fue influenciada por el CFT o el FL.

La ubicación geográfica fue la carácteristica que en mayoría permitió una distinción y agrupamiento claro, según lo percibido en el análisis multivariado, su entorno destacó frente a la época del año en la afectación del metaboloma de la planta, examinando a este en términos de las similaridad entre muestras.

De tal manera, el presente trabajo de investigación es pionero en cuanto al estudio metabolómico del género *Lupinus* (*Fabaceae*). Las especies trabajadas demostraron que el género tiene un metaboloma bastante variable en gran medido influenciado por la geografía y expresado en variabilidad de la composición química y perfiles cromatográficos dependiendo tanto de las plantas como de los órganos.

Un metaboloma variable como el del género *Lupinus* da pie para continuar con la búsqueda de moléculas que permitan generar y fomentar el desarrollo de compuestos activos como alternativa terapéutica para el control de enfermedades, como las de tipo antidiabético, antiinflamatorio y antimicrobiano, entre otras.

Al presente, lo que queda es continuar la investigación con mayor rigor, pues no se conocen con exactitud lo factores responsables de dicha variabilidad. Por tanto, se hace necesario realizar estudios tanto cualitativos como cuantitativos, pero esta vez con plantas sembradas bajo condiciones y variables conocidas y controladas, por ejemplo, generando a las plantas un ambiente distinto entre ellas, con diferente iluminación, cambios de temperatura, condiciones de estrés,entre otros. De esta manera se llevaría a la posible generación de un metaboloma más específico y reproducible, con mayor probabilidad de acercarse a aquellas

moléculas que puedan producirse bajo condiciones controladas y así poder unificar las características influyentes para la obtención/aislamiento de este tipo de metabolitos en el laboratorio.

Así como, el estudio de metabolitos particulares, por ejemplo, los alcaloides quinolizidínicos (evidenciados en el presente trabajo en casi todas las partes pero no incluidos en la tesis) o antocianinas (también evidenciadas en flores), además sería bueno extender la investigación pero centrándose en cada especie por separado, puesto que hacerlo con todas al tiempo no es funcional.

ANEXOS

CAPÍTULO 2: Variabilidad química y capacidad captadora de radicales libres de especies de *Lupinus.*

Tabla 2.1. Ubicación geográfica y fecha de colección de los especímenes**.**

Num. colecta	Num. interna	Fecha	Ubicación	Coordenadas	Especie
1	1	18/08/2013	Cucaita	Lat: 5,546812 Lon:-73,460893	*L. bogotensis*
2	2	18/08/2013	Vía Cucaita-Tunja	Lat: 5,556513 Lon:-73,43236	*L.bogotensis*
3	3	18/01/2014	Vía. Embalse la Regadera	Lat: 4,39852 Lon:-74,13783	*L.guascensis*
4	4	12/10/2013	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat:4,38757 Lon:-74,16629	*L. mirabilis*
4A	40	18/01/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat:4,38757 Lon:-74,16629	
4B	41	22/03/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat:4,38757 Lon:-74,16629	
4C	42	11/07/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat:4,38757 Lon:-74,16629	
5	5	12/10/2013	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat: 4,387603 Lon:-74,16631	

5A	50	18/01/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat: 4,387603 Lon:-74,16631	*L. mirabilis*
5B	51	22/03/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat: 4,387603 Lon:-74,16631	
5C	52	11/07/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat: 4,387603 Lon:-74,16631	
6	6	18/01/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat: 4,38772 Lon:-74,16639	*L. mirabilis*
6A	60	11/07/2014	Puente embalse el Hato. Derecha vía-páramo	Lat: 4,38772 Lon:-74,16639	
7	7	20/10/2013	200m Laguna Iguaque		*L.bogotensis*
8	8	14/01/2014	UMNG. Sede Cajicá	Lat: 4,94195 Lon:-74,00969	*L. mirabilis*
9	9	14/01/2014	UMNG. Sede Cajicá	Lat: 4,92140 Lon:-74,00966	*L. mirabilis*
10	10	18/01/2014	Puente embalse el Hato. Izquierda vía-páramo	Lat:4,38736 Lon:-74,16679	*L. mirabilis*
10A	100	22/03/2014	Puente embalse el Hato. Izquierda vía-páramo	Lat:4,38736 Lon:-74,16679	
11	11	18/01/2014	Bojacá. Aprox 1.4 km de la Vía US21	Lat: 4,65374 Lon:-74,30359	*L. pubescens*
12	12	18/01/2014	Bojacá. Aprox 1.3 km de la Vía US21	Lat: 4,65379 Lon:-74,30364	*L. pubescens*
13	13	18/01/2014	Bojacá. Aprox 1.2 km de la Vía US21	Lat:4,65257 Lon:-74,30327	*L. pubescens*

14	14	22/03/2014	Embalse el Hato. Aprox 100 m después del puente	Lat:4,38711 Lon:-74,16691	*L. pubescens*
15	15	22/03/2014	Embalse el Hato. Aprox 230 m antes del puente	Lat:4,38686 Lon:-74,16408	*L. bogotensis*
16	16	22/03/2014	Embalse el Hato. Aprox 220 m antes del puente	Lat:4,38683 Lon:-74,16419	*L. bogotensis*
17	17	22/03/2014	Vía embalse el Hato. Entrada izq a 300 m del puente. 530 m de la entrada	Lat:4,38361 Lon:-74,16675	*L. mirabilis*
18	18	22/03/2014	Vía embalse el Hato. Entrada izq a 300 m del puente. 572 m de la entrada	Lat:4,38327 Lon:-74,16688	*L. mirabilis*
19	19	22/03/2014	Vía laguna de Chizacá. Aprox 3,6 km en línea recta	Lat:4,32175 Lon:-74,20680	*L. humifusus*
20	20	22/03/2014	Vía laguna de Chizacá. Aprox 5,0 km en línea recta	Lat:4.33294 Lon:-74.20677	*L. humifusus*
21	21	29/03/2014	Villapinzón pocas plantas	Lat:5.21213 Lon:-73.59780	*L. bogotensis*
22	22	29/03/2014	Sobre montaña Villapinzón Altura planta 1,10 m	Lat: 5.23075 Lon:-73.59244	*L. bogotensis*
23	23	29/03/2014	300 m antes del puente de Boyacá	Lat: 5,43941 Lon:-73.44047	*L. bogotensis*
24	24	29/03/2014	Letrero bienvenidos a Samacá	Lat:5.48505 Lon:-73.47716	*L. bogotensis*
25	25	29/03/2014	Después de Samacá via Tunja	Lat:5.55063 Lon:-73.4345	*L. bogotensis*
26	26	29/03/2014	Después de Samacá via Tunja	Lat:5.55063 Lon:-73.4345	*L. bogotensis*

27	27	29/03/2014	De regreso vía Tunja Samacá	Lat:5.56094 Lon:-73.41233	*L. bogotensis*
28	28	29/03/2014	Montaña – antena. Samacá	Lat: 5.55488 Lon:-73.43266	*L. bogotensis*
29	29	29/03/2014	Sobre la carretera. Vía Cucaita-Tunja	Lat:5.55488 Lon:-73.43266	*L. bogotensis*
30	30	-	Machetá	Lat:5.084199 Lon:-73.603978	*L.bogotensis*
31	31	29/03/2014	Vía Samacá. Altura planta 60 cm	Lat:5.48236 Lon:-73.46930	*L. bogotensis*
32	32	-	Avenida Carrera 7 con calle 170, Bogotá	Lat: 4.747481 Lon: -74.022599	*L.bogotensis*
33	33	11/07/2014	Vía embalse el Hato. Izquierda	Lat:4.386814 Lon:-74.164701	*L. guascensis*
34	34	11/07/2014	Vía laguna de Chizacá. Derecha	Lat: 4.386975 Lon:-74.167125	*L. guascensis*
35	35	11/07/2014	Vía laguna de Chizacá. Derecha	Lat:4.373528 Lon:-74.185144	*L. guascensis*
36	36	11/07/2014	Vía laguna de Chizacá. Izquierda	Lat:4.362285 Lon:-74.190444	*L. mutabilis*
37	37	11/07/2014	Vía laguna de Chizacá. Izquierda	Lat:4.345779 Lon:-74.199979	*L. guascensis*
38	38	11/07/2014	Vía laguna de Chizacá. Izquierda	Lat: 4.308795 Lon:-74.209506	*L. guascensis*
39	39	11/07/2014	Vía laguna de Chizacá. Izquierda	Lat: 4.322489 Lon:-74.206760	*L. guascensis*

Tabla 2.2. Identificación taxonómica.

Espécimen	No.COL	Determinó	Especie
1	569767	C. Parra	*Lupinus bogotensis* Benth.
3	572778	A. Jara	*Lupinus guascensis* C.P. Sm.
5	572777	A. Jara	*Lupinus mirabilis* C.P. Sm.
11	572776	A. Jara	*Lupinus* cf. *pubescens* Benth.
12	572775	A. Jara	*Lupinus* cf. *pubescens* Benth.
16	575472	A. Jara	*Lupinus amandus* C.P. Sm.(*Lupinus bogotensis)*
19	575471	A. Jara	*Lupinus humifusus* Benth.
21	576286	C. Parra	*Lupinus amandus* C.P. Sm. (*Lupinus bogotensis)*
22	576291	C. Parra	*Lupinus amandus* C.P. Sm. (*Lupinus bogotensis)*
23	576289	C. Parra	*Lupinus amandus* C.P. Sm. (*Lupinus bogotensis)*
24	576288	C. Parra	*Lupinus amandus* C.P. Sm. *(Lupinus bogotensis)*
25	576287	C. Parra	*Lupinus amandus* C.P. Sm. *(Lupinus bogotensis)*
36	579434	C. Parra	*Lupinus mutabilis* Sweet

Tabla 2.3. Contenido de Fenoles, flavonoides y capacidad captadora de radicales libres.

Espécimen	Parte	CFT[a] (mg EAG/g MS)	FL[a] (mg EQ/g MS)	CCRL[a] (mM ET/mg ES)
1	Hojas	1,67 ±0,06	0,68 ± 0,01	91,78 ± 5,66
	Tallos	1,08 ±0,04	0,19 ±0,01	43,50 ± 0,95
2	Hojas	3,54 ±0,09	0,79 ± 0,04	123,93 ±1,39
	Tallos	1,38 ± 0,03	0,23 ± 0,00	77,67 ± 4,10
	Flores	4,74 ± 0,36	1,33 ± 0,06	97,42 ± 2,48
	Vainas	2,12 ± 0,13	0,14 ± 0,01	150,02 ± 5,56
	Semillas	4,03 ± 0,31	-	23,38 ± 1,82
3	Hojas	2,97 ± 0,08	2,44 ± 0,04	256,42 ± 19,39
	Tallos	4,76 ± 0,04	0,71 ± 0,01	152,78 ± 2,76
	Flores	5,55 ± 0,21	0,74 ± 0,04	219,78 ± 18,23
4	Hojas	7,07 ± 0,15	1,97 ± 0,01	265,06 ± 4,44
	Tallos	1,86 ± 0,05	0,30 ± 0,01	109,81 ± 7,80
	Flores	3,15 ± 0,22	0,68 ± 0,02	109,46 ± 9,24
	Vainas	3,30 ± 0,05	0,17 ± 0,01	193,93 ± 11,20
	Semillas	2,96 ± 0,08	-	38,96 ± 1,86
4A	Hojas	5,83 ± 0,07	2,15 ± 0,00	435,14 ± 14,14
	Flores	2,93 ± 0,13	0,38 ± 0,01	59,91 ± 5,03
	Vainas	2,56 ± 0,02	0,18 ± 0,00	174,73 ± 6,63
	Semillas	3,06 ±0,10	-	22,51 ± 1,02
4B	Hojas	4,41 ± 0,07	1,40 ± 0,03	468,35 ± 20,39

	Tallos	1,29 ± 0,09	0,17 ± 0,01	174,65 ±4,39
	Flores	3,45 ± 0,05	0,42 ± 0,01	150,76 ± 10,03
	Vainas	1,59 ± 0,04	0,15 ± 0,01	143,05 ± 4,95
	Semillas	2,81 ± 0,07	-	27,26 ± 2,38
4C	Hojas	5,12 ± 0,23	1,86 ± 0,07	398,35 ± 14,32
	Tallos	1,17 ± 0,06	0,19 ± 0,01	186,22 ± 0,65
	Flores	2,48 ± 0,10	0,30 ± 0,04	246,39 ± 9,49
	Vainas	0,64 ±0,02	0,09 ± 0,01	104,91 ± 6,51
	Semillas	3,19 ± 0,05	-	30,52 ± 2,18
5	Hojas	5,01 ± 0,11	1,43 ± 0,04	352,05 ± 9,46
	Tallos	1,41 ± 0,05	0,12 ± 0,01	165,43 ± 2,87
	Flores	4,16 ± 0,35	0,87 ± 0,05	83,19 ± 2,52
	Vainas	2,70 ± 0,06	0,16 ± 0,01	144,74 ± 0,88
	Semillas	2,56 ± 0,07	-	22,68 ± 1,93
5A	Hojas	5,63 ± 0,08	2,09 ± 0,11	385,39 ± 5,35
	Tallos	0,83 ± 0,06	0,15 ± 0,02	68,20 ± 4,45
	Flores	2,76 ± 0,22	0,54 ± 0,04	135,04 ± 9,21
	Vainas	2,93 ± 0,27	0,18 ± 0,01	191,28 ± 6,03
5B	Hojas	4,42 ± 0,10	1,57 ± 0,08	309,81 ± 26,09
	Tallos	2,25 ± 0,09	0,19 ± 0,00	95,47 ± 2,85
	Flores	3,32 ± 0,04	0,35 ± 0,02	139,36 ± 2,96
	Vainas	0,72 ± 0,02	0,07 ± 0,01	79,45 ± 4,05
5C	Hojas	2,77 ± 0,06	0,94 ± 0,04	444,45 ± 3,22
	Tallos	1,91 ± 0,05	0,24 ± 0,01	160,87 ± 6,78
	Flores	2,21 ± 0,12	0,30 ± 0,00	278,20 ± 9,12
	Vainas	1,52 ± 0,03	0,16 ± 0,01	120,09 ± 2,79
	Semillas	3,16 ± 0,27	-	20,24 ± 1,25

6	Hojas	5,72 ± 0,09	1,97 ± 0,04	333,54 ± 9,22
	Tallos	0,40 ± 0,06	0,18 ± 0,01	53,97 ± 3,06
	Flores	4,88 ± 0,23	1,64 ± 0,01	170,54 ± 6,95
	Vainas	1,67 ± 0,02	0,13 ± 0,00	235,62 ± 11,80
	Semillas	2,89 ± 0,19	-	30,19 ± 0,93
6A	Hojas	2,87 ± 0,19	0,89 ± 0,04	566,94 ± 38,95
	Tallos	1,00 ± 0,08	0,17 ± 0,01	188,41 ± 10,14
	Flores	2,93 ± 0,18	0,35 ± 0,01	242,19 ± 5,57
	Vainas	1,59 ± 0,09	0,17 ± 0,01	149,79 ± 3,44
	Semillas	3,33 ± 0,16	-	22,87 ± 0,54
7	Tallos	4,62 ± 0,14	0,67 ± 0,01	123,96 ± 2,95
	Flores	5,92 ± 0,50	1,93 ± 0,19	116,84 ± 9,12
8	Hojas	5,22 ± 0,25	1,93 ± 0,11	124,34 ± 3,99
	Tallos	2,48 ± 0,03	0,39 ±0,00	89,27 ± 4,17
	Flores	5,84 ± 0,18	0,50 ± 0,01	882,27 ± 21,05
	Vainas	2,28 ± 0,11	0,21 ± 0,01	152,10 ± 6,61
	Semillas	2,10 ± 0,18	-	10,49 ± 0,67
9	Hojas	4,84 ± 0,09	1,80 ± 0,05	127,78 ± 5,06
	Tallos	1,82 ± 0,14	0,30 ± 0,02	67,99 ± 1,41
	Flores	4,47 ± 0,28	0,87 ± 0,04	88,82 ± 5,57
	Vainas	1,81 ± 0,07	0,17 ± 0,01	144,66 ± 3,91
	Semillas	2,47 ± 0,25		13,62 ± 1,04
10	Hojas	1,98 ± 0,13	1,52 ± 0,04	334,70 ± 14,78
	Tallos	0,87 ± 0,00	0,16 ± 0,00	115,54 ± 3,41
	Flores	2,88 ± 0,21	0,71 ± 0,06	186,38 ±

				10,29
10A	Flores	3,63 ± 0,10	0,41 ± 0,01	48,22 ± 2,84
	Vainas	0,93 ±0,10	0,11 ± 0,01	101,17 ± 6,22
	Semillas	1,83 ± 0,05	-	17,84 ± 0,63
11	Hojas	7,51 ± 0,06	2,94 ± 0,07	66,45 ± 2,65
	Tallos	1,05 ± 0,05	0,19 ± 0,01	62,78 ± 3,33
12	Hojas	6,81 ± 0,03	2,30 ± 0,07	71,15 ± 1,26
	Tallos	4,12 ± 0,18	0,57 ± 0,01	97,29 ± 4,23
	Flores	4,16 ± 0,24	0,76 ± 0,08	63,00 ± 3,44
	Vainas	2,58 ± 0,06	0,16 ± 0,00	228,07 ± 4,82
	Semillas	3,15 ± 0,12	-	28,83 ± 1,97
13	Hojas	7,47 ± 0,14	2,51 ± 0,04	23,07 ± 1,14
	Tallos	4,11 ± 0,43	0,61 ± 0,01	118,75 ± 3,25
14	Hojas	6,08 ± 0,08	1,50 ± 0,02	95,02 ± 1,79
	Tallos	2,69 ± 0,05	0,23 ± 0,00	177,58 ± 3,59
	Flores	4,45 ± 0,10	0,48 ± 0,01	103,87 ± 3,75
	Vainas	2,55 ± 0,09	0,24 ± 0,00	180,70 ± 3,46
	Semillas	2,06 ± 0,10	-	23,45 ± 0,91
15	Hojas	2,85 ± 0,03	0,68 ± 0,03	52,83 ± 1,90
	Tallos	3,33 ± 0,27	0,48 ± 0,03	86,32 ± 1,54
	Flores	2,94 ± 0,08	0,35 ± 0,01	96,47 ± 2,60
	Vainas	2,06 ± 0,05	0,21 ± 0,01	162,00 ± 5,76
	Semillas	2,51 ± 0,17	-	5,47 ± 0,81
16	Hojas	4,56 ± 0,17	1,12 ± 0,04	160,60 ± 7,26
	Tallos	2,86 ± 0,12	0,30 ± 0,01	93,42 ± 5,63
	Vainas	1,21 ± 0,03	0,16 ± 0,01	105,96 ± 3,95
	Semillas	1,49 ± 0,05	-	10,57 ± 0,27
17	Hojas	8,23 ± 0,08	2,93 ± 0,02	327,70 ± 1,55
	Tallos	1,28 ± 0,10	0,15 ± 0,00	160,13 ±7,98
	Flores	3,05 ± 0,10	0,35 ± 0,01	199,13 ± 7,67

	Vainas	1,79 ± 0,29	0,16 ± 0,01	230,09 ± 5,86
	Semillas	2,55 ± 0,07	-	21,98 ± 0,70
18	Hojas	5,18 ± 0,34	1,40 ± 0,08	263,60 ± 4,51
	Tallos	1,59 ± 0,04	0,21 ± 0,01	161,21 ± 9,39
	Flores	3,65 ± 0,10	0,52 ± 0,02	129,64 ± 3,75
	Vainas	2,52 ± 0,11	0,17 ± 0,00	190,67 ± 4,00
	Semillas	2,69 ± 0,27	-	23,23 ± 0,55
19	Hojas	5,61 ± 0,42	1,18 ± 0,09	243,24 ± 2,32
	Tallos	3,65 ± 0,21	0,63 ± 0,00	223,12 ± 6,92
	Flores	5,87 ± 0,35	0,71 ± 0,02	179,79 ± 10,94
20	Hojas	4,78 ± 0,31	1,03 ± 0,07	102,78 ± 1,44
	Tallos	1,79 ± 0,06	0,26 ± 0,01	209,27 ± 9,12
	Flores	5,17 ± 0,05	0,78 ± 0,04	381,49 ± 12,13
	Vainas	1,87 ± 0,03	0,24 ± 0,00	240,30 ± 6,52
21	Hojas	8,07 ± 0,15	1,84 ± 0,12	66,00 ± 1,37
	Tallos	3,56 ± 0,07	0,51 ± 0,01	94,11 ± 2,57
	Vainas	2,42 ± 0,08	0,23 ± 0,00	133,33 ± 4,41
	Semillas	2,13 ± 0,33	-	22,37 ± 0,71
22	Hojas	7,67 ± 0,03	1,74 ± 0,11	68,83 ± 4,08
	Tallos	3,42 ± 0,08	0,48 ± 0,01	89,82 ± 3,12
	Flores	3,39 ± 0,01	0,43 ± 0,02	122,19 ± 5,03
	Vainas	3,15 ± 0,06	0,28 ± 0,00	98,82 ± 2,68
	Semillas	1,99 ± 0,13	-	17,12 ± 0,95
23	Hojas	8,64 ± 0,20	2,30 ± 0,05	343,34 ± 5,35
	Tallos	5,49 ± 0,05	0,41 ± 0,00	251,20 ± 7,47
	Flores	3,93 ± 0,10	0,70 ± 0,01	185,78 ± 6,30
	Vainas	2,30 ± 0,04	0,21 ± 0,00	256,79 ± 2,28
	Semillas	1,90 ± 0,11	-	14,33 ± 0,14

24	Hojas	2,04 ± 0,20	0,42 ± 0,03	1,89 ± 0,06
	Tallos	0,92 ± 0,02	0,07 ± 0,01	52,83 ± 3,59
	Flores	2,58 ± 0,06	0,27 ± 0,01	80,83 ± 2,84
	Vainas	0,80 ± 0,03	0,08 ± 0,01	135,16 ± 3,38
	Semillas	1,74 ± 0,05	-	15,28 ± 0,83
25	Hojas	2,50 ± 0,11	0,65 ± 0,03	44,03 ± 1,37
	Tallos	1,55 ± 0,12	0,09 ± 0,01	95,68 ± 5,65
	Flores	2,67 ±0,17	0,31 ± 0,01	141,59 ± 7,60
	Vainas	1,43 ± 0,01	0,11 ± 0,01	206,39 ± 2,83
	Semillas	1,85 ± 0,09	-	13,36 ± 1,28
26	Hojas	2,78 ± 0,06	0,73 ± 0,01	44,08 ± 2,90
	Tallos	4,65 ± 0,04	0,12 ± 0,02	86,00 ± 2,79
	Flores	2,33 ± 0,05	0,34 ± 0,01	144,33 ± 5,77
	Vainas	1,74 ± 0,18	0,13 ± 0,01	149,95 ± 2,59
	Semillas	3,24 ± 0,08	-	28,10 ± 0,86
27	Hojas	2,89 ± 0,18	0,75 ± 0,04	33,04 ± 1,81
	Tallos	2,16 ± 0,09	0,11 ± 0,00	88,33 ± 4,00
	Flores	4,43 ± 0,15	0,38 ± 0,02	73,29 ± 2,58
	Vainas	2,42 ± 0,19	0,14 ± 0,01	88,95 ± 2,30
28	Hojas	2,61 ± 0,04	0,67 ± 0,04	52,81 ± 2,82
	Tallos	1,87 ± 0,08	0,16 ± 0,00	157,85 ± 4,19
	Vainas	2,32 ± 0,09	0,18 ± 0,00	166,30 ± 6,21
29	Hojas	2,34 ± 0,07	0,62 ± 0,02	29,12 ± 1,23
	Tallos	1,06 ± 0,20	0,09 ± 0,01	51,67 ± 3,32
	Flores	3,12 ± 0,05	0,29 ± 0,02	69,16 ± 2,03
	Vainas	0,94 ± 0,06	0,11 ± 0,00	324,01 ±24,34
	Semillas	1,96 ± 0,25	-	17,71 ± 0,24
30	Hojas	6,32 ± 0,08	1,43 ± 0,07	94,44 ± 4,60
	Tallos	1,14 ± 0,03	0,12 ± 0,02	144,35 ±5,02

	Flores	2,90 ± 0,16	0,39 ± 0,01	162,62 ± 10,52
	Vainas	1,51 ± 0,26	0,12 ± 0,00	161,35 ± 5,08
31	Hojas	6,00 ± 0,38	1,15 ± 0,03	68,19 ± 1,16
	Tallos	2,07 ± 0,22	0,17 ± 0,03	186,20 ± 5,40
	Flores	3,68 ± 0,18	0,38 ± 0,01	90,58 ± 2,47
	Vainas	0,62 ± 0,07	0,07 ± 0,01	12,81 ± 0,28
	Semillas	1,26 ± 0,11	-	12,88 ± 0,89
32	Hojas	6,58 ± 0,05	1,24 ± 0,04	62,06 ± 0,38
	Tallos	1,63 ± 0,03	0,15 ± 0,03	97,15 ± 1,14
	Vainas	0,89 ± 0,07	0,07 ± 0,00	125,77 ± 7,17
33	Hojas	7,17 ± 0,06	1,74 ± 0,06	349,90 ± 7,17
	Tallos	1,62 ± 0,01	0,17 ± 0,01	172,84 ± 11,68
	Flores	2,61 ± 0,16	0,26 ± 0,01	207,26 ± 13,89
	Vainas	3,18 ± 0,04	0,20 ± 0,00	187,97 ± 4,70
	Semillas	2,38 ± 0,05	-	16,13 ± 0,55
34	Hojas	4,06 ± 0,36	1,63 ± 0,14	282,23 ± 8,66
	Tallos	1,02 ± 0,05	0,12 ± 0,01	144,68 ± 12,43
	Flores	6,14 ± 0,52	0,50 ± 0,02	196,07 ± 14,17
35	Hojas	4,81 ±0,06	1,34 ± 0,07	62,55 ± 4,46
	Tallos	1,46 ± 0,15	0,15 ± 0,02	114,71 ± 7,78
	Flores	2,06 ± 0,14	0,31 ± 0,02	152,82 ± 2,75
	Vainas	1,51 ± 0,03	0,15 ± 0,00	168,41 ± 2,53
	Semillas	1,00 ± 0,10	-	18,20 ± 1,13
36	Hojas	5,32 ± 0,05	1,82 ± 0,10	75,82 ± 3,56
	Tallos	2,97 ± 0,17	0,37 ± 0,01	125,41 ± 4,56

	Flores	4,04 ± 0,20	0,57 ±0,01	84,40 ± 0,68
	Vainas	1,17± 0,05	0,14 ± 0,00	146,31 ± 3,74
	Semillas	2,10 ± 0,10	-	11,80 ± 0,86
37	Hojas	8,65 ± 0,24	1,31 ± 0,04	223,26 ±4,21
	Tallos	2,90 ± 0,05	0,27 ± 0,01	188,38 ± 4,09
	Flores	6,48 ± 0,09	0,65 ± 0,05	205,16 ± 12,28
	Vainas	2,73 ± 0,16	0,18 ± 0,00	14,08 ± 1,15
38	Hojas	5,06 ± 0,18	1,10 ± 0,09	141,72 ± 1,17
	Tallos	2,81 ± 0,03	0,25 ± 0,02	253,58 ± 2,42
39	Hojas	10,23 ± 0,30	2,11 ± 0,04	227,63 ± 3,41
	Tallos	3,35 ± 0,03	0,35 ± 0,01	201,39 ± 7,05
	Flores	3,30 ± 0,20	0,52 ± 0,04	274,65 ± 5,77
	Vainas	2,57 ± 0,02	0,42 ± 0,01	273,42 ± 4,00

[a] **Media ± intervalo de confianza**

CAPÍTULO 3: Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)

Tabla 3.1. Visualización de picos en cada extracto de las hojas evaluados. Presencia: ✔ ausencia: _

E / P	1	2	3	4	4A	4B	4C	5	5A	5C	6	6A	7	8	9	10	10A	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	✔	_	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
2	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔
3	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔
4	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	✔	✔	_	_	✔	✔	✔
5	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	_	✔
6	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔
7	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	_
8	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_
9	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	_	_
10	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
11	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	_		_	✔	_	_	_
12	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	✔	_	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔	_
13	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔
14	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	_
15	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_
16	_	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_
17	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔
18	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔
19	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	✔	_
20	✔	✔	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔
21	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	_

22	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
23	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	_	✔	_	_
24	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	✔	_	✔
25	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
26	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
27	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
28	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_

Tabla 3.2. Visualización de picos en cada extracto de los tallos evaluados. Presencia: ✔ ausencia: _

P \ E	1	2	3	4	4b	4c	5	5a	5b	5c	6	6a	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	31	32	33	35	36	37	38	39
1	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_
2	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
3	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔
4	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔
5	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	_	✔
6	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	_	✔	✔	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔
7	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
8	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔
9	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	✔	_	✔	_	✔	_	_	_	✔	_	✔
10	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	_	_	_
11	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
12	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
13	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
14	_	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔
15	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔

16	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	✔
17	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔
18	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
19	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
20	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
21	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_
22	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔
23	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
24	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
25	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
26	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
27	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
28	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_

Tabla 3.3. Visualización de picos en cada extracto de flores evaluado. Presencia: ✔ ausencia: _

E / P	**2**	**3**	**4**	**4a**	**4b**	**4c**	**5**	**5a**	**5b**	**5c**	**6**	**6a**	**7**	**8**	**9**	**10**	**10a**	**12**	**14**	**15**	**17**	**18**	**19**	**20**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**29**	**30**	**31**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**39**
1	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	
2	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔
3	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	_	_	_	_	_	_
4	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
5	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	✔	✔		✔	✔
6		✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	_		✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	_	✔	✔	✔
7	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	✔	_	✔	✔	✔
8	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
9	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔

10	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
11	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
12	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔
13	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_
14	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
15	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
16	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
17	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
18	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
19	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
20	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔		✔	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_
21	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
22	✔		_	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	_		_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
23	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔
24	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
25	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
26	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
27	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
28	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_

Tabla 3.4. Visualización de picos en cada extracto de vainas evaluado. Presencia: ✔ ausencia: _. P: Pico. E: Extracto.

E / P	2	4	4a	4b	4c	5	5a	5b	5c	6	8	9	10a	12	14	15	16	17	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	35	36	37	39
1	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_		✔	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_
2	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
3	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_

4	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
5	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	_	_	✔	_
6	_	_	✔	_	_		✔	_	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_
7	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_		✔	✔		_	_	✔	_	_	✔
8	✔	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔
9	✔	✔	✔	_	_			_	_	_	✔	✔	_	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔		✔	✔	_	✔	_	✔	_	_	_
10	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	✔	_	_	_
11	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
12	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
13	✔	✔	✔			✔	✔		✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
14	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔
15	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
16	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
17		✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	_	_	✔	_	_	_	_	✔	_	_	_	_
18	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
19	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
20	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
21	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	✔		✔	_	✔	_	_	_	_	_		✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
22	_	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔
23	✔	_	✔	_	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	_	_	_	_
24	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
25	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
26	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
27	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
28	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_

Tabla 3.5. Visualización de picos en cada extracto de semillas evaluado. Presencia: ✔ ausencia: _. P: Pico. E: Extracto.

E / P	**2**	**4**	**4a**	**4b**	**4c**	**5**	**5c**	**6**	**6a**	**8**	**9**	**10A**	**12**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**29**	**31**	**33**	**35**	**36**
1	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_
2	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_
3	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
4	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
5	_	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	_	_	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_
6	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
7	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	_	_	_	✔	_	✔	_	✔	_	_	✔	_	_	_
8	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_
9	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	✔
10	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
11	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
12	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	_	✔	_	_	✔	✔	_	_
13	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	✔	✔	_	_
14	_	_	_	_	_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
15	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
16	✔	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_
17	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
18	✔	_	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	_	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔
19	✔	_	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	✔	_	✔	_	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_
20	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
21	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
22	_	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	_	_	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	_
23	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
24	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_

25	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	✔	_		✔	✔	✔	✔	✔	✔
26	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	_	✔	✔	_	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	_
27	✔	_		_	✔	_	_	✔	✔	_	_	_	✔	_	_	✔	✔	_	_	✔	_	_	_	_	_	_	✔	_	_
28	✔	_	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	_	✔	_	✔	_	✔	✔	✔	_	_	✔	✔	✔	_

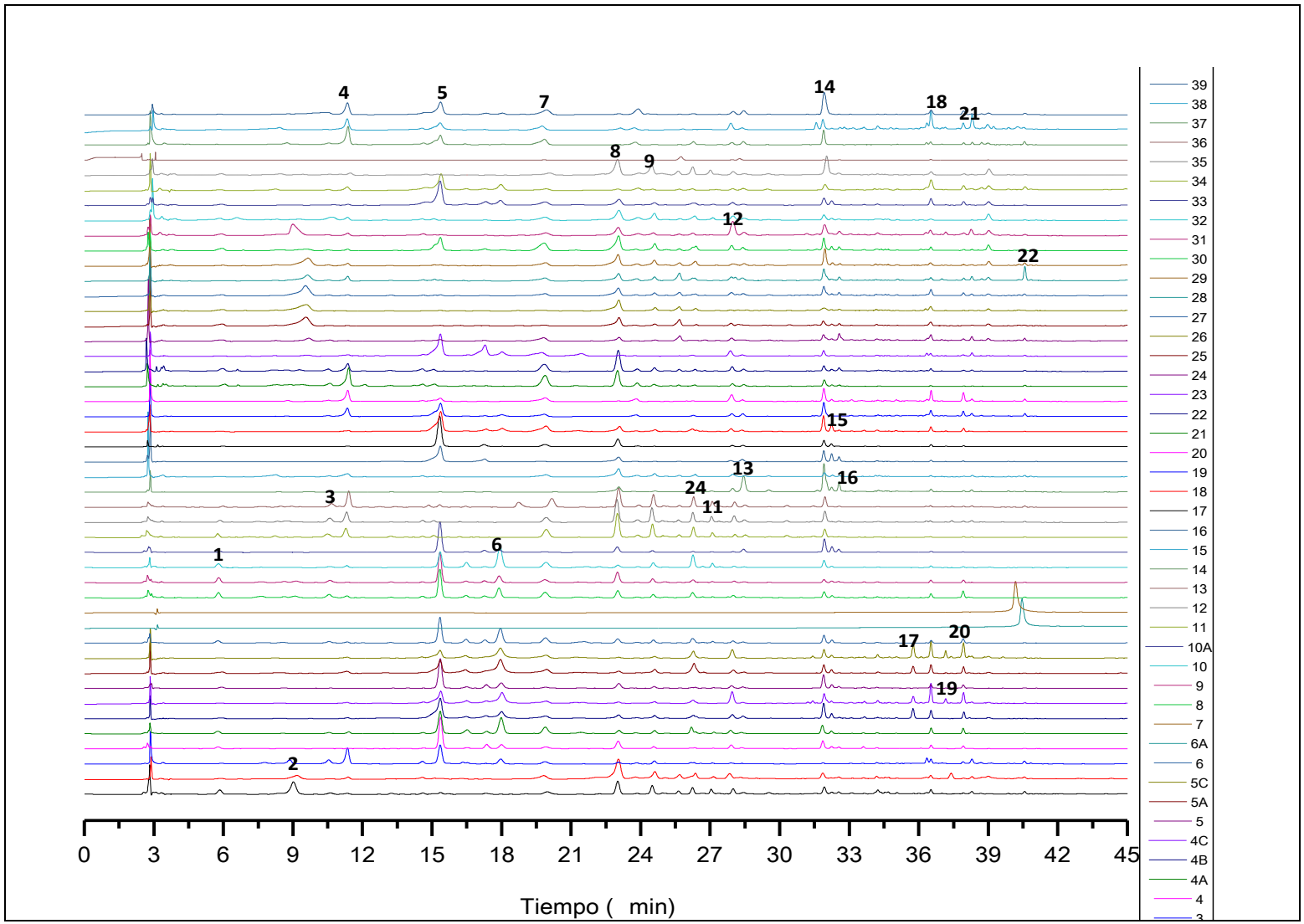


Figura 3.1. Cromatogramas de CLAE de todos los extractos etanólicos de hojas

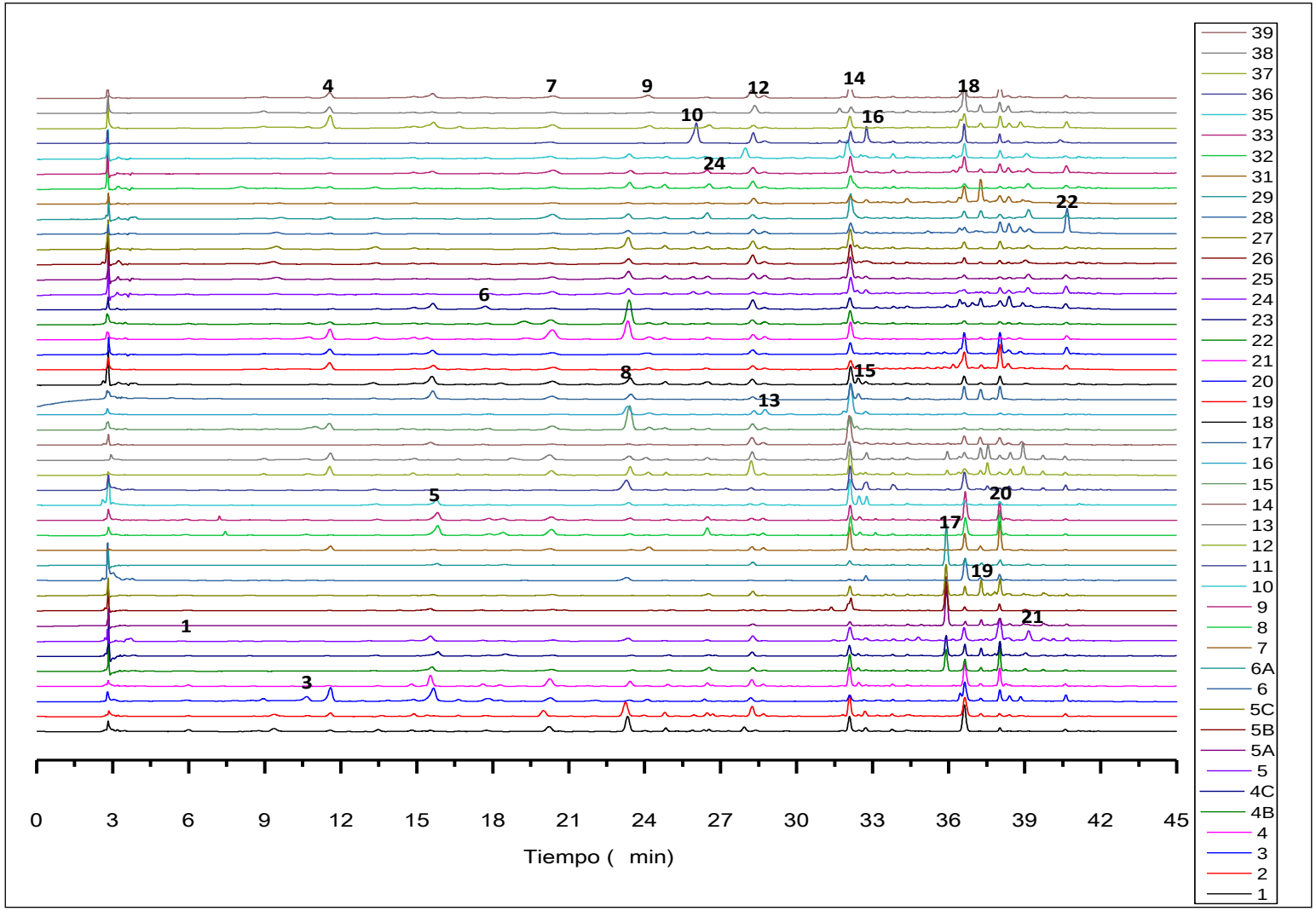


Figura 3.2. Cromatogramas de CLAE de todos los extractos etanólicos de tallos.

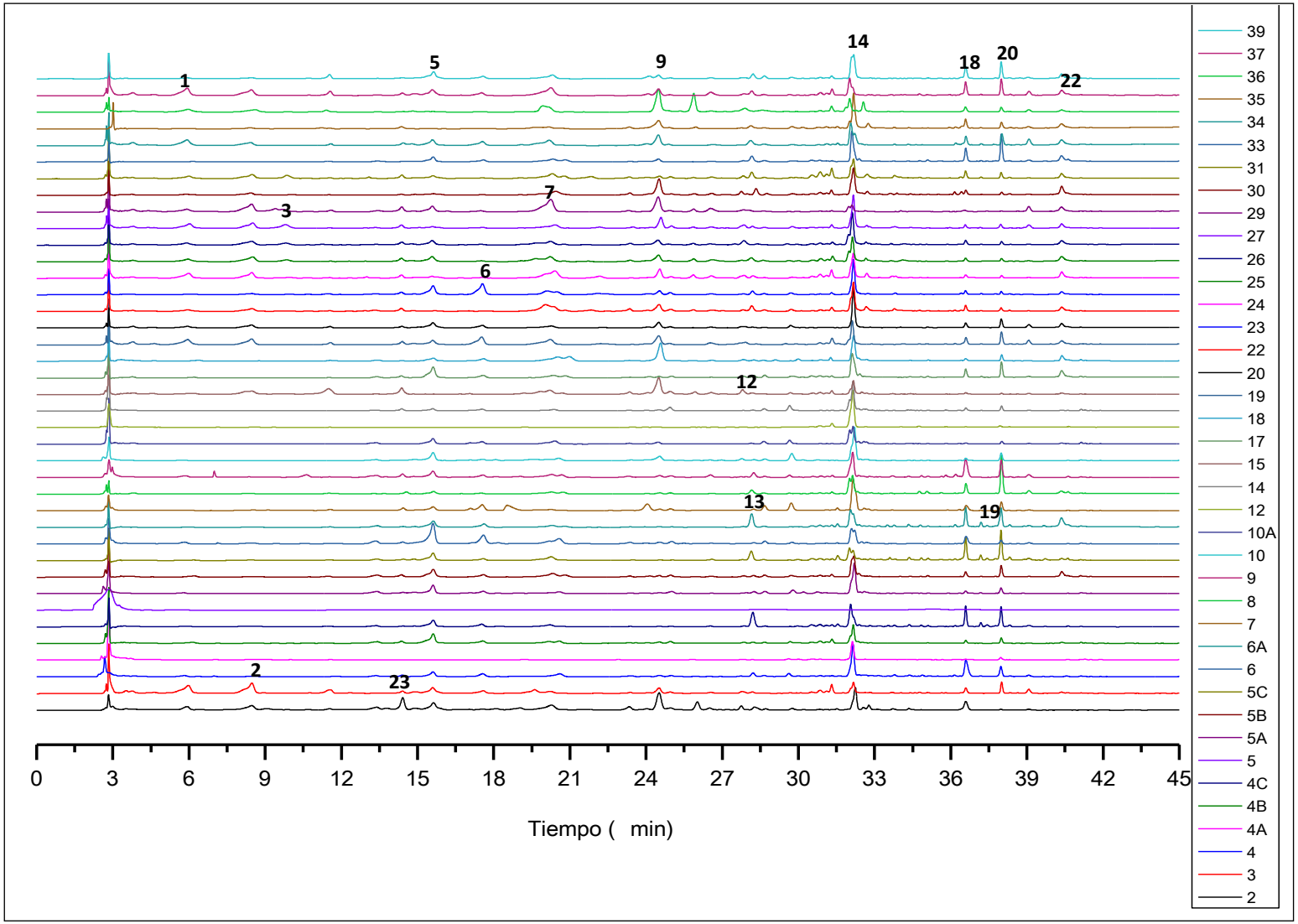


Figura 3.3. Cromatogramas de CLAE de todos los extractos etanólicos de flores.

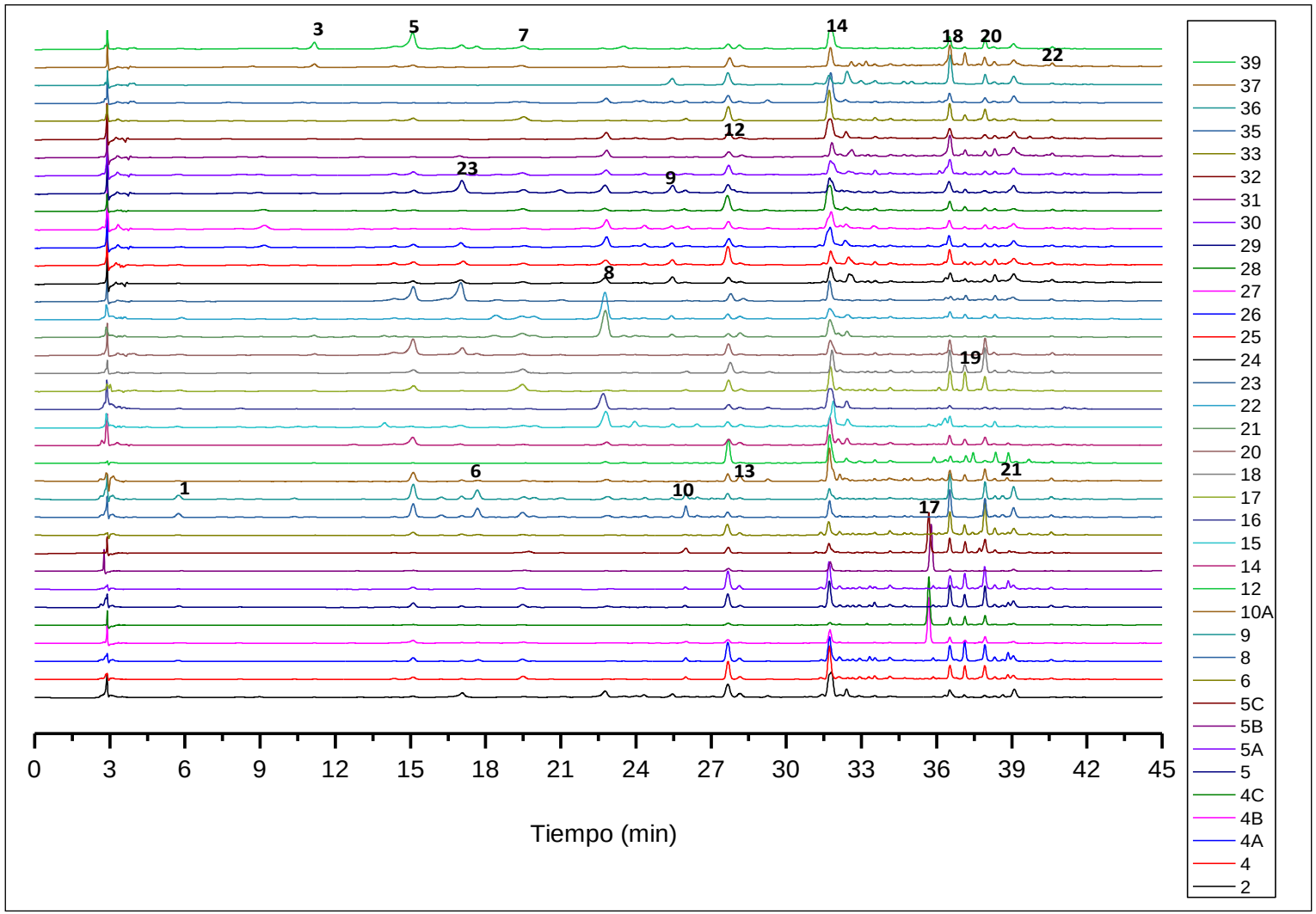


Figura 3.4. Cromatogramas de CLAE de todos los extractos etanólicos de vainas

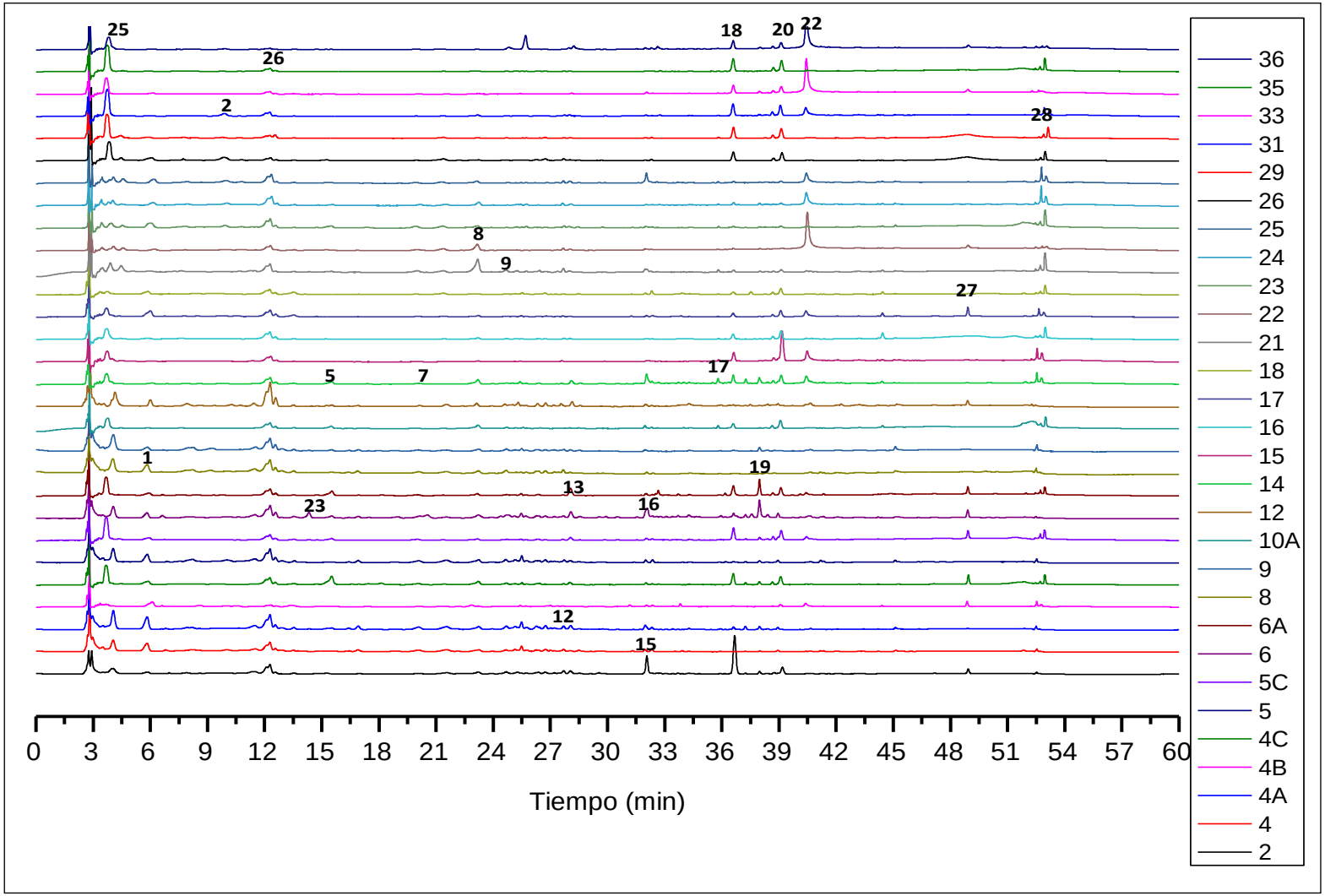


Figura 3.5. Cromatogramas de CLAE de todos los extractos etanólicos de semillas.

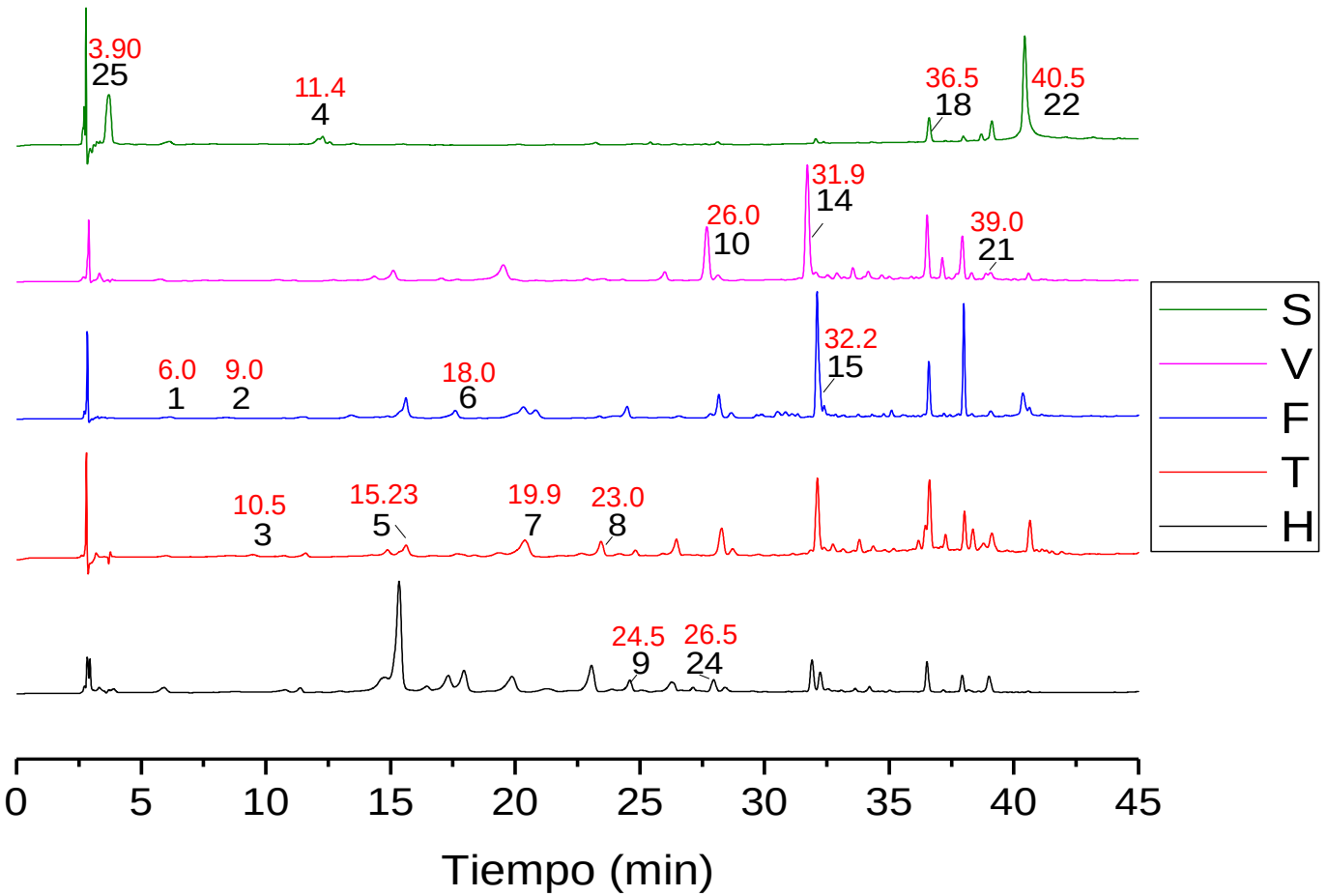


Figura 3.6.. Perfiles cromatográficos de las diferentes partes del ejemplar 33(*L.guascensis*). H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas

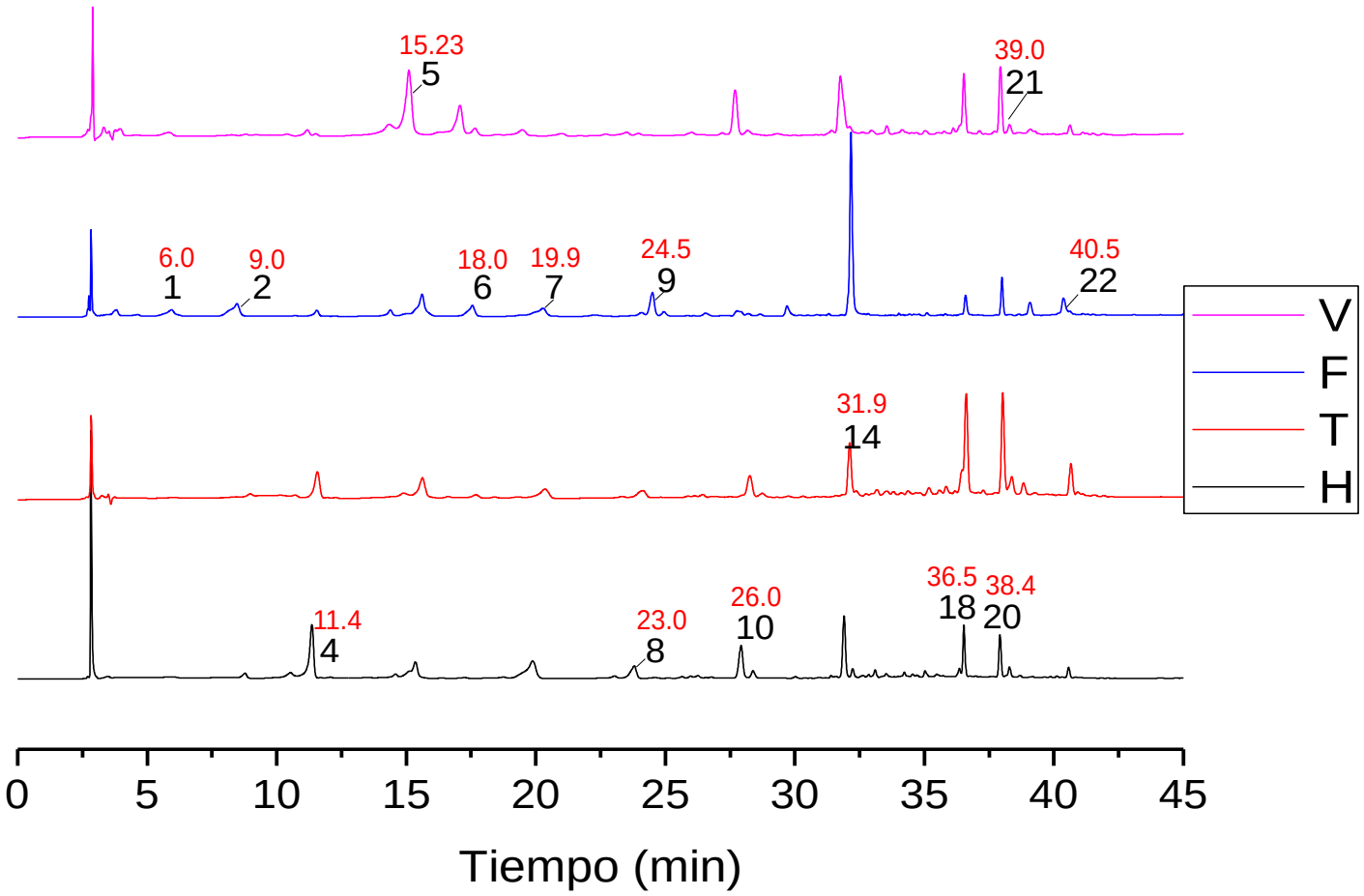


Figura 3.7. Perfiles cromatográficos de las diferentes partes del ejemplar 20 (*L.humifusus*). H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas.

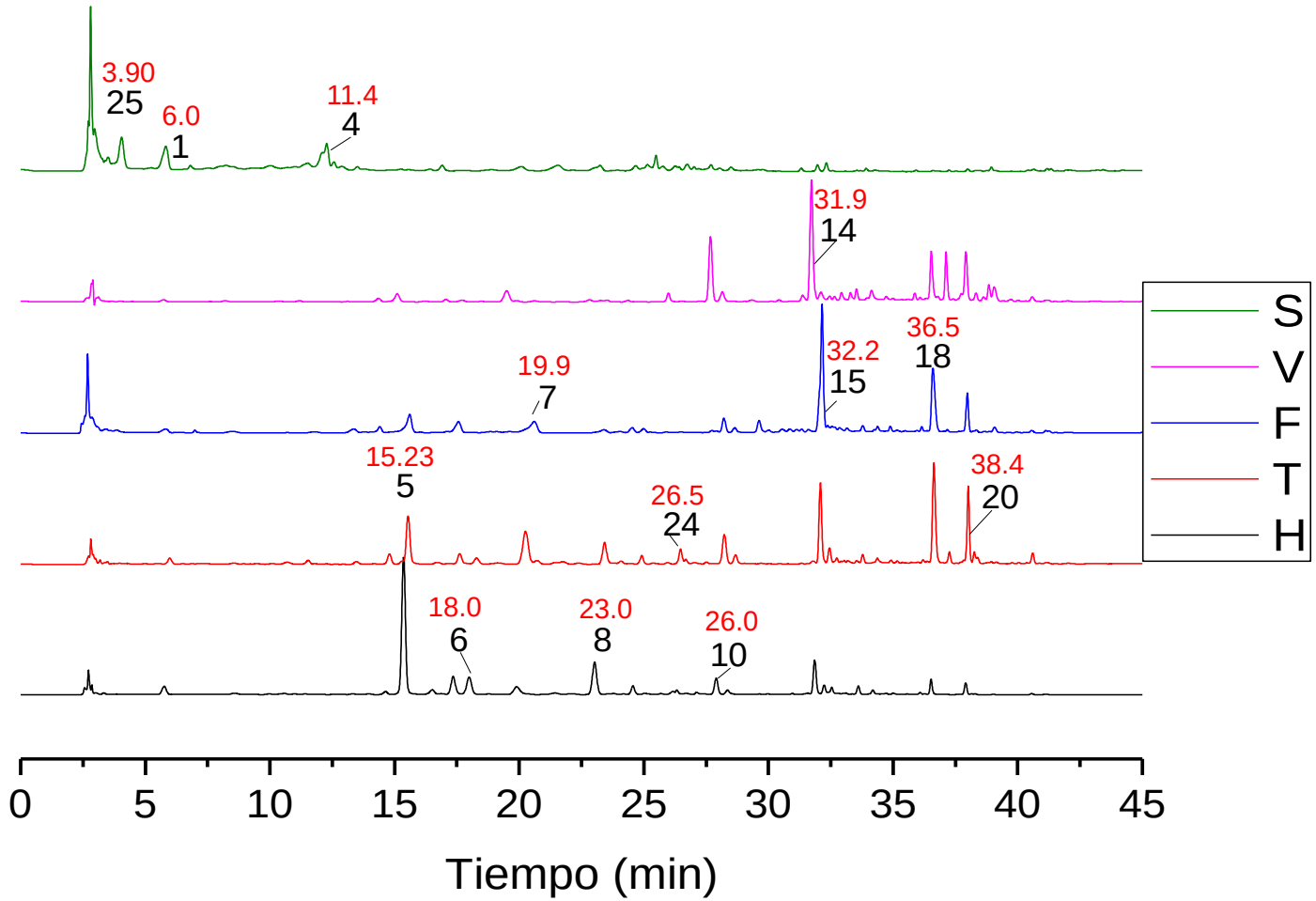


Figura 3.8. Perfiles cromatográficos de las diferentes partes del ejemplar 4 (*L.mirabilis*). H: Hojas. T: Tallos. F: Flores. V: Vainas. S: Semillas

CAPÍTULO 4: Relaciones metabólicas en especies pertenecientes al género *Lupinus* a partir del perfilado cromatográfico y datos cuantitativos.

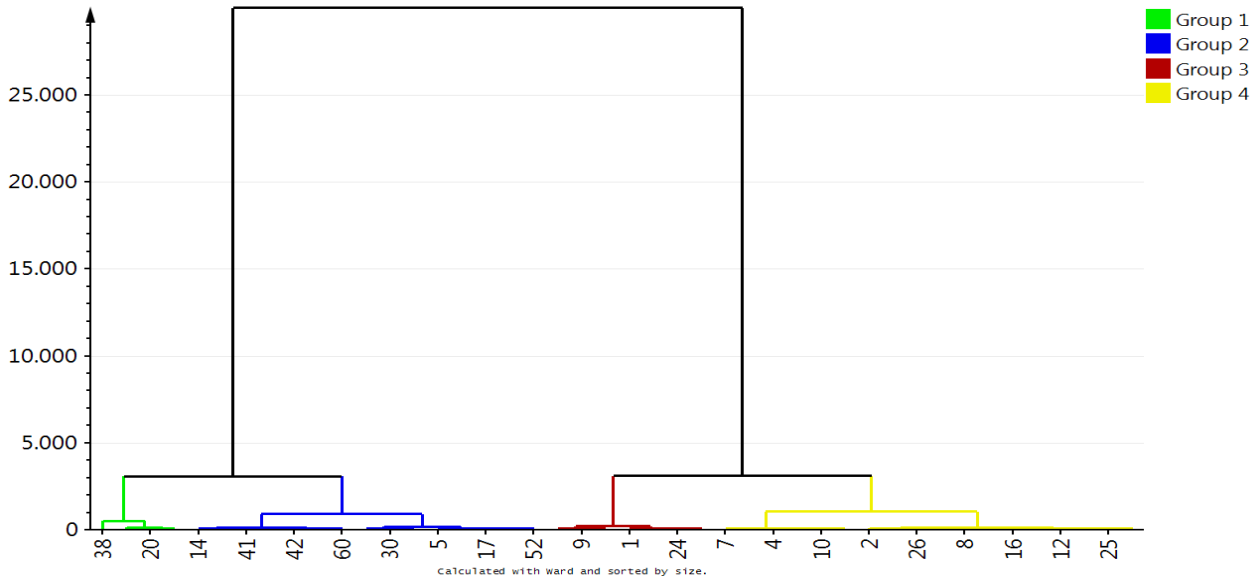


Figura 4.1. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con la caracterización química de los extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4**.**

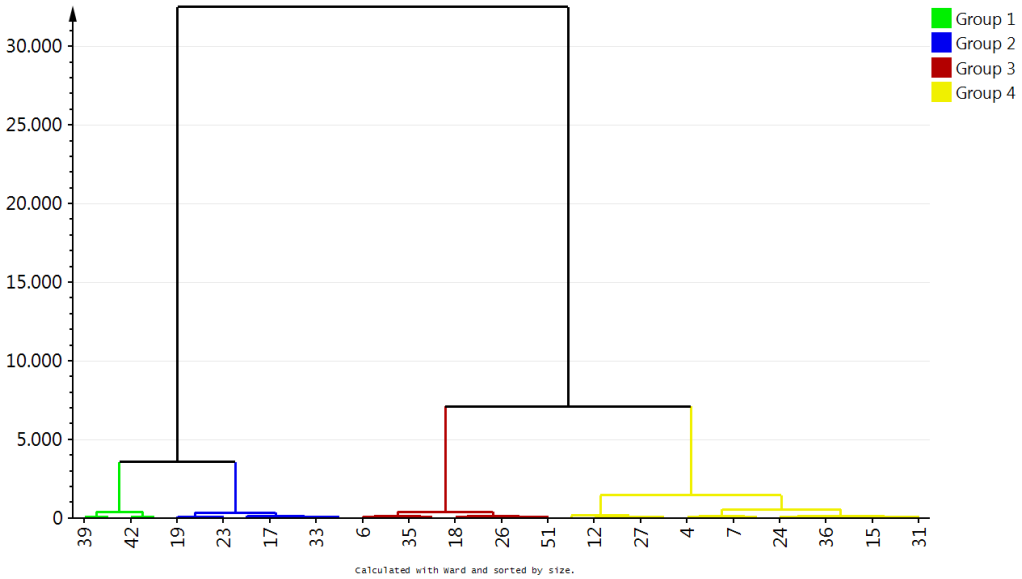


Figura 4.2. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con la caracterización química de los extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4**.**

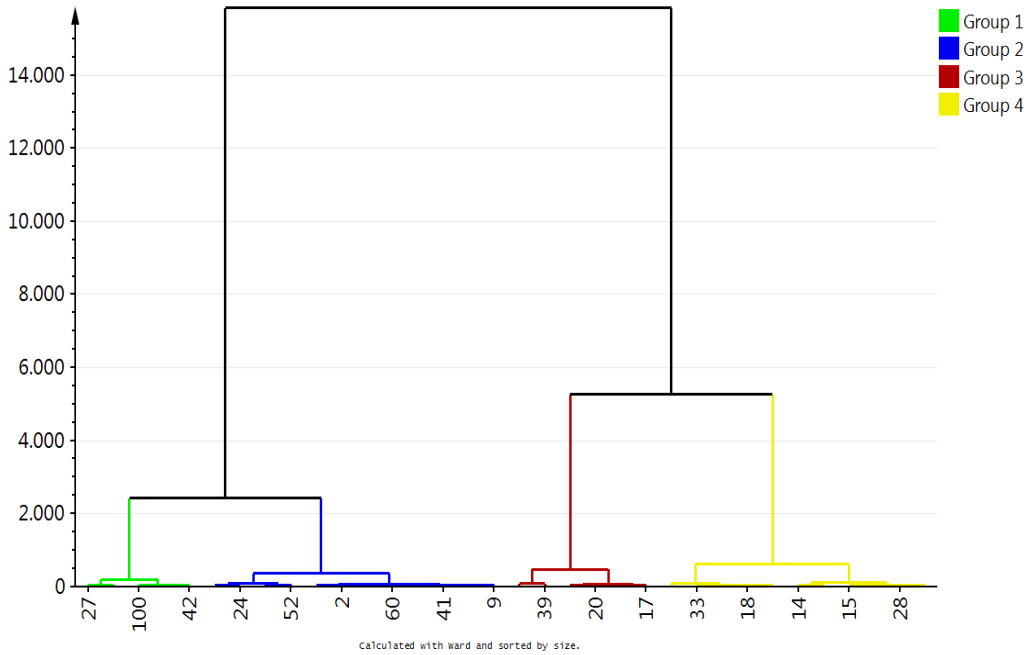


Figura 4.3. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con la caracterización química de los extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4**.**

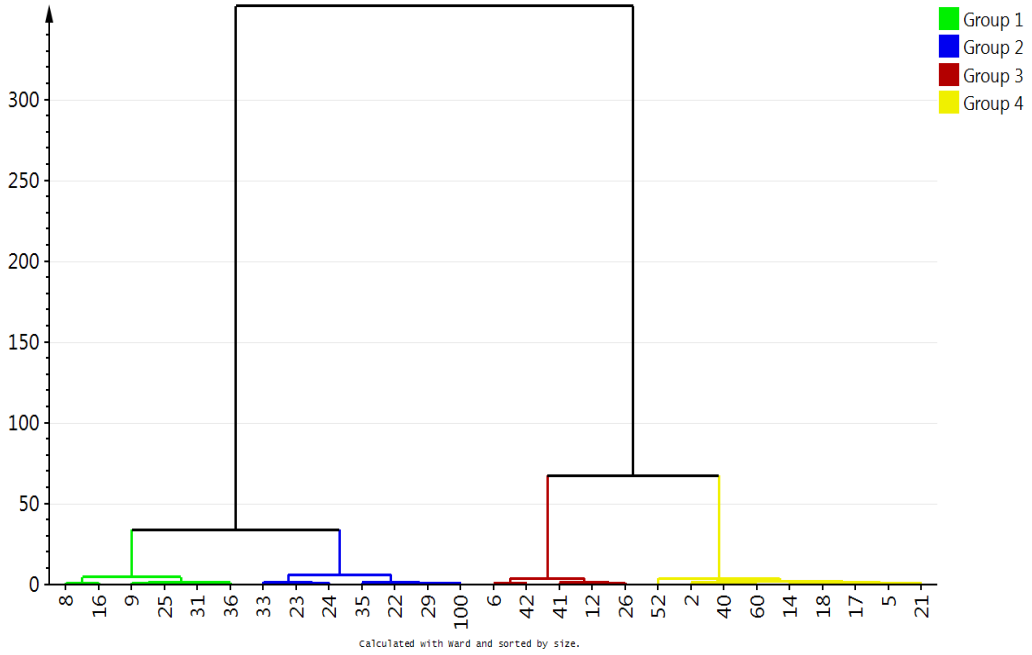


Figura 4.4. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con la caracterización química de los extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3. Amarillo: Grupo 4**.**

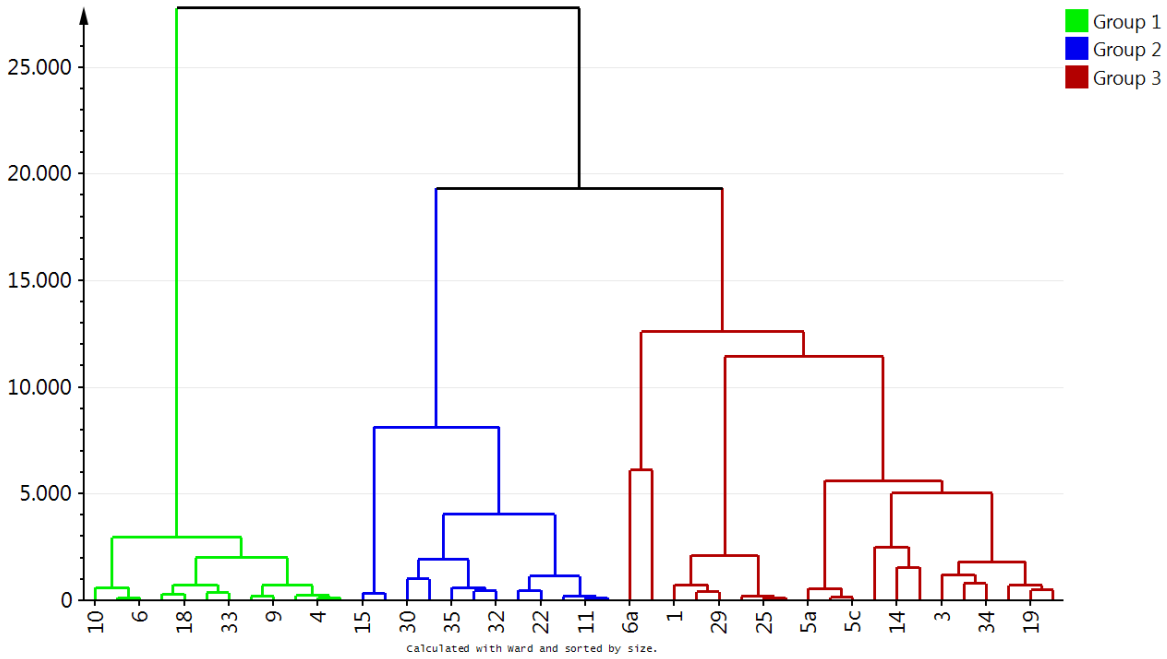


Figura 4.5. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

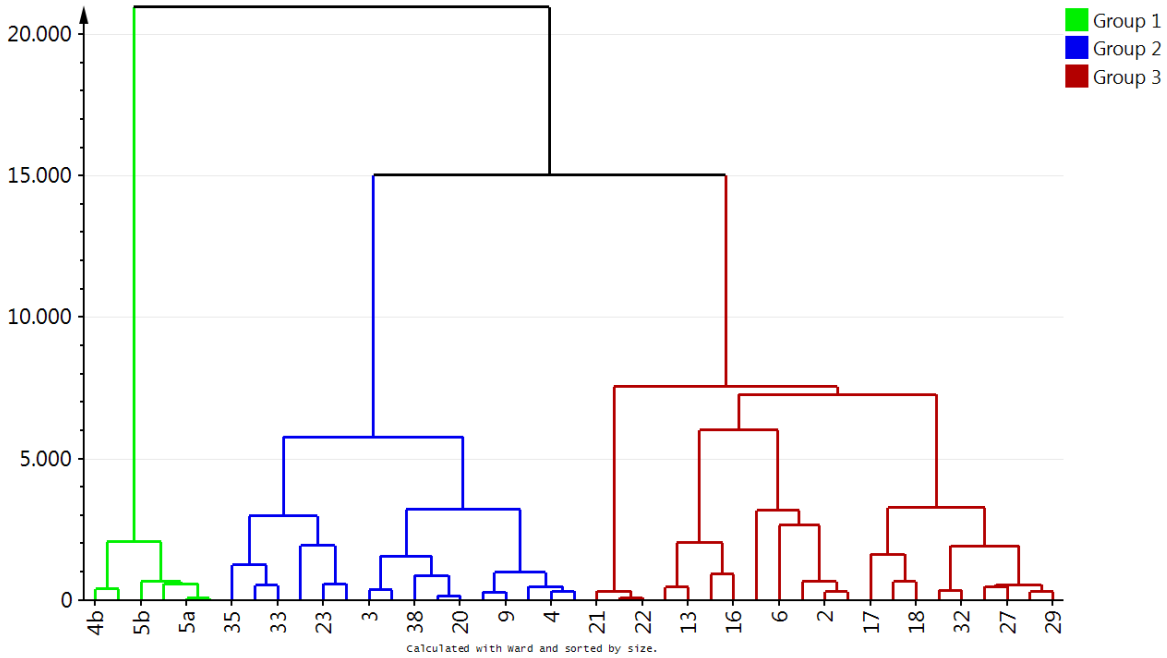


Figura 4.6. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de tallos de especies *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

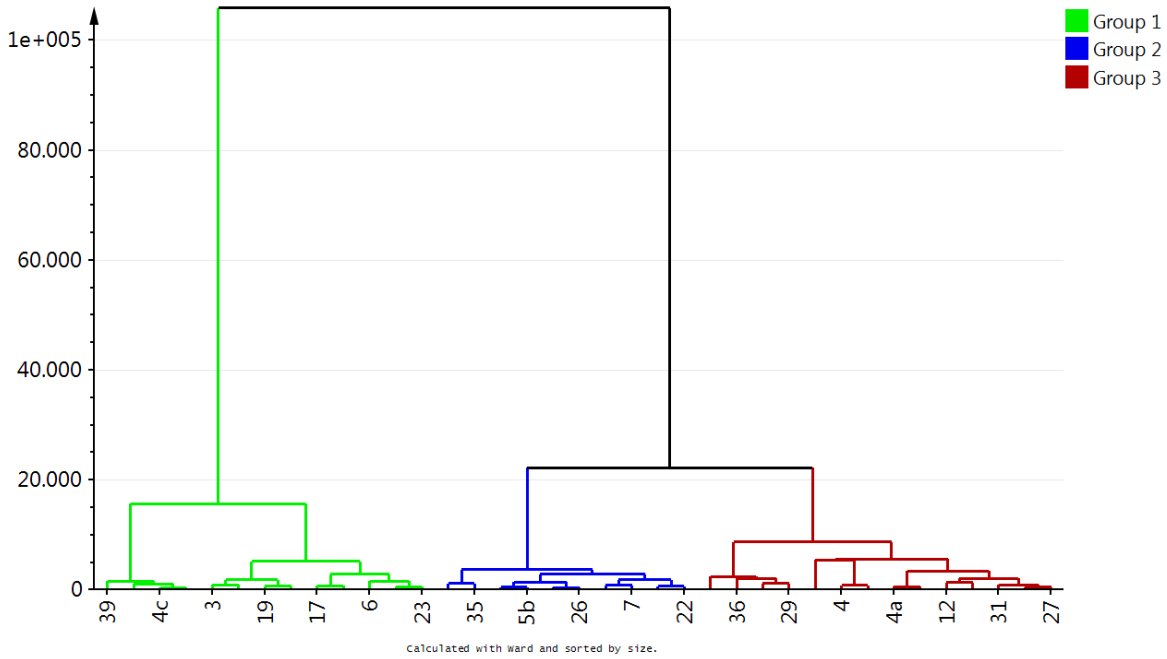


Figura 4.7. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

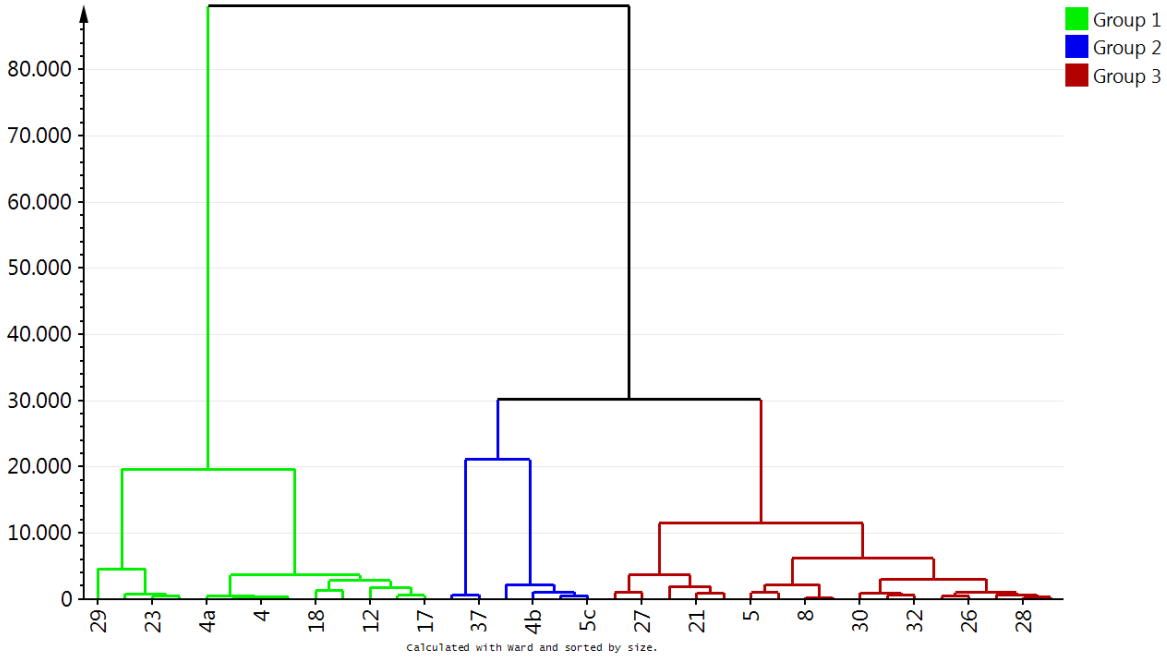


Figura 4.8. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus* (Dendrograma Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

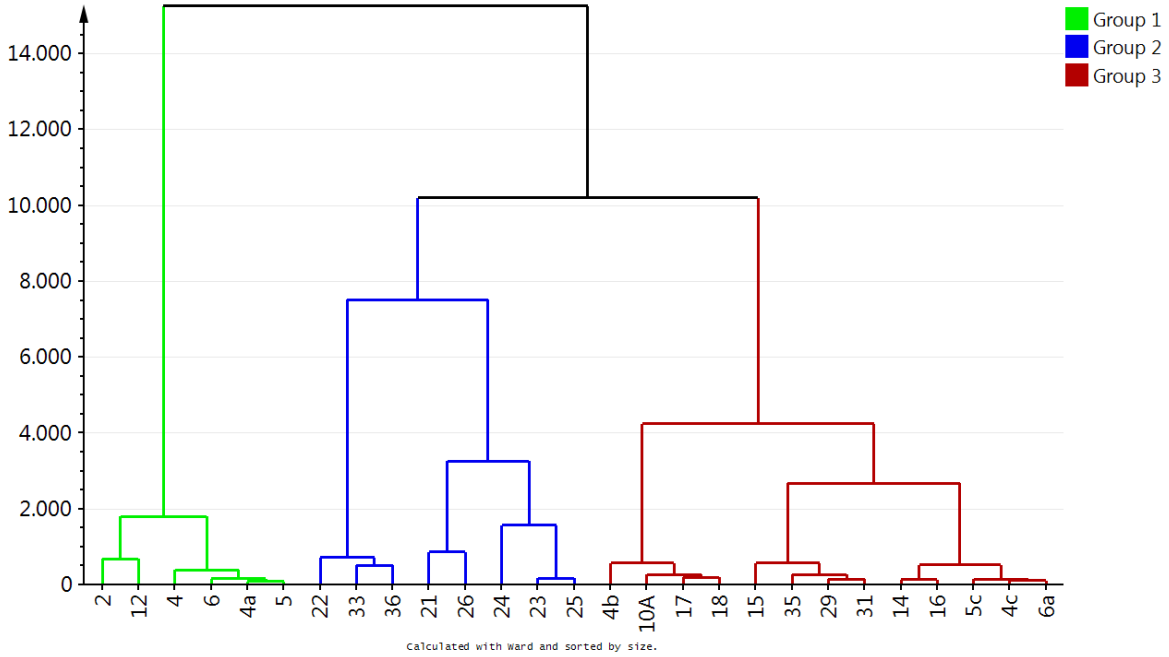


Figura 4.9. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) con los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus* (Dendrograma). Verde: Grupo 1. Azul: Grupo 2. Rojo: Grupo 3

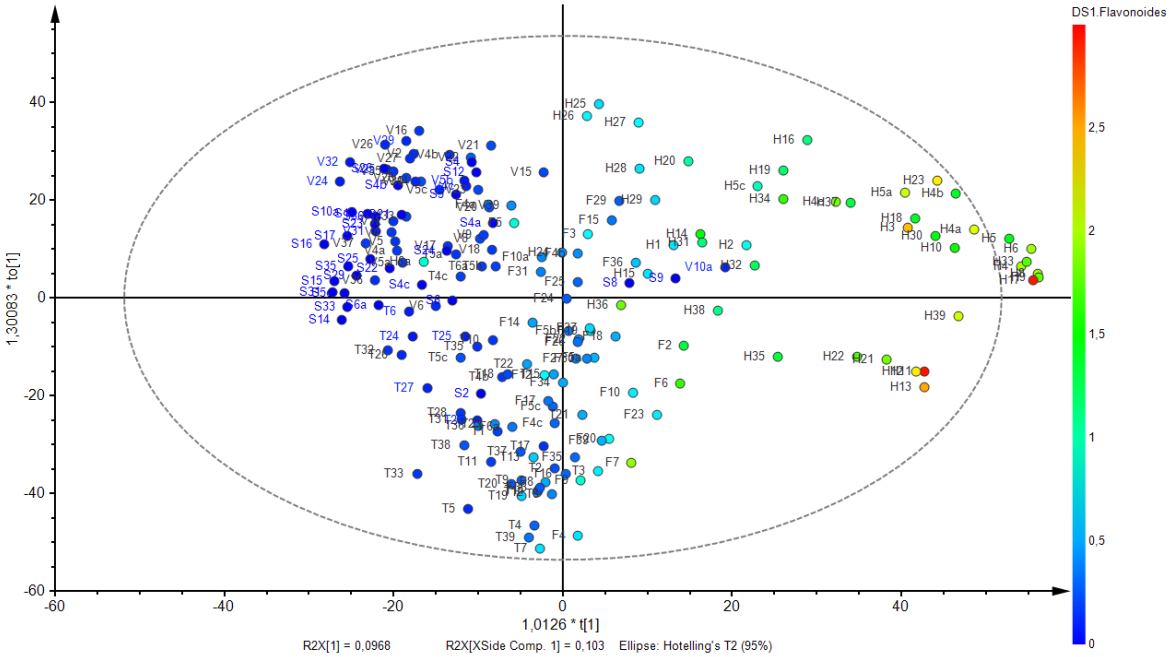


Figura 4.10. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos especies de *Lupinus*, supervisado por FL.

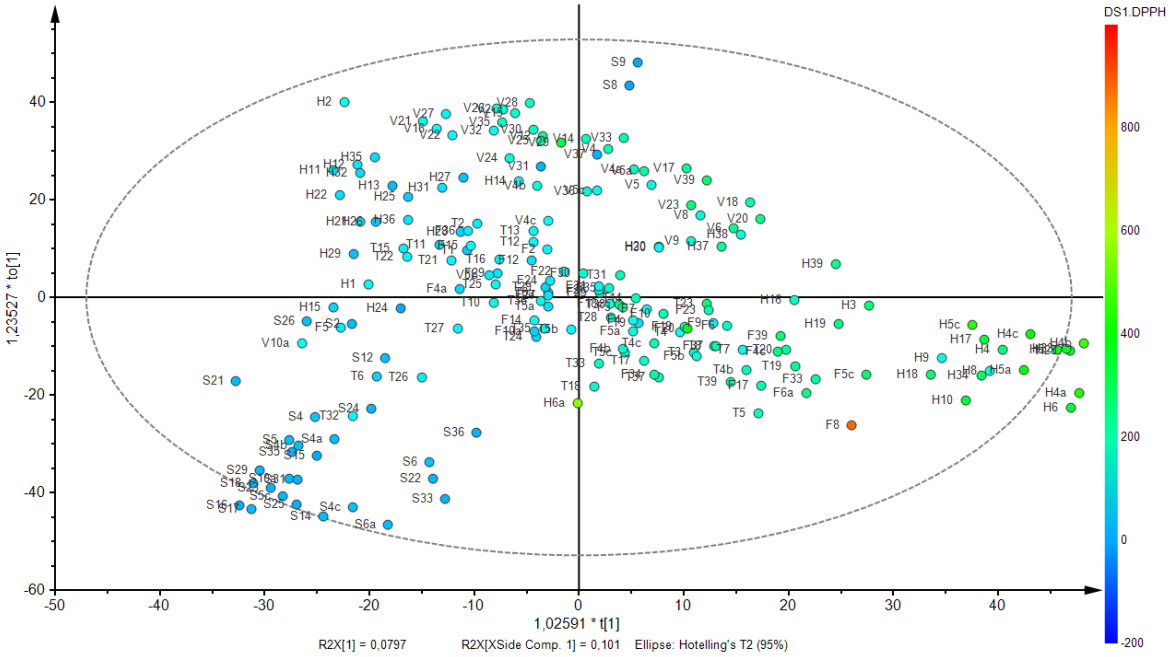


Figura 4.11. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos especies de *Lupinus*, supervisado por CCRL.

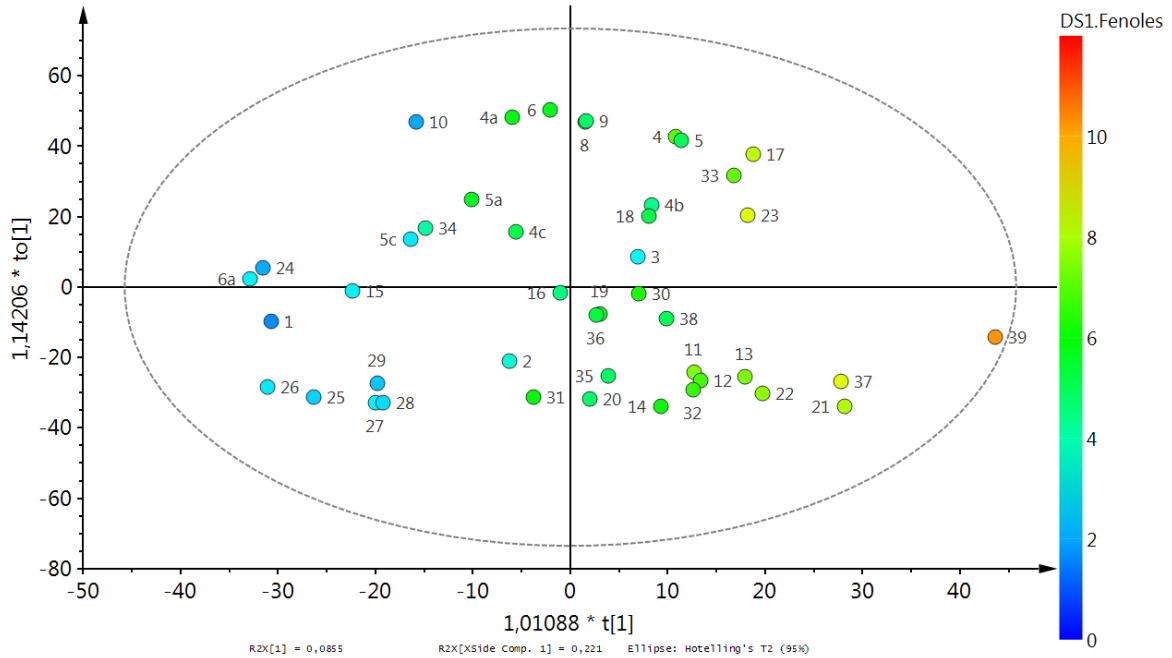


Figura 4.12. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus*, supervisado por CFT.

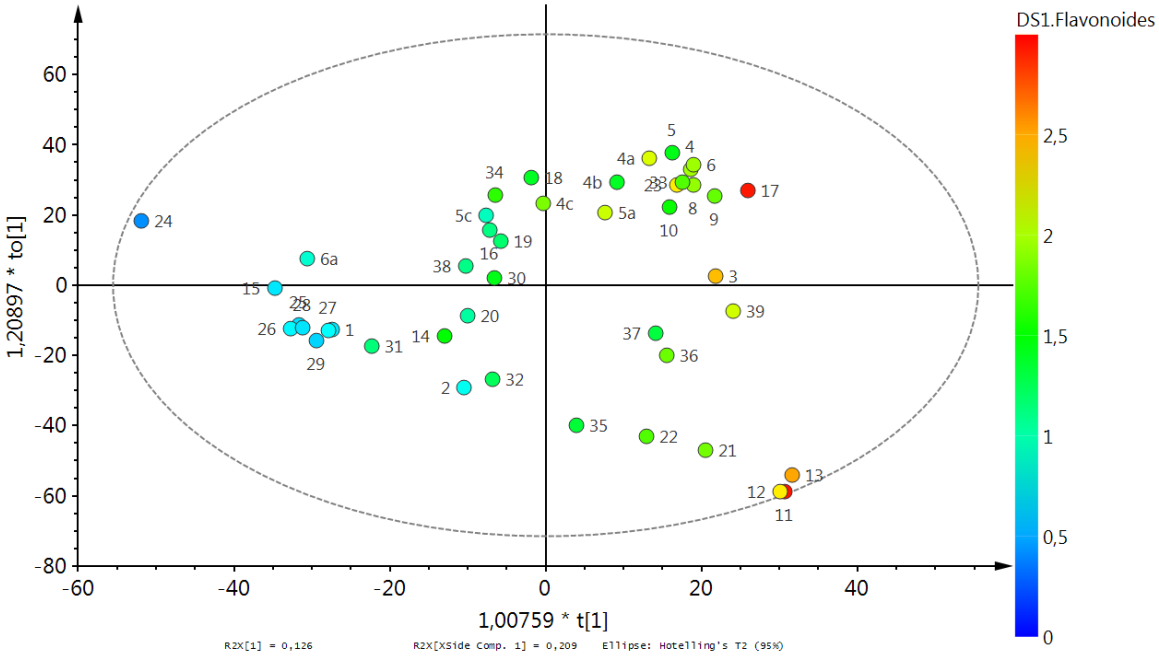


Figura 4.13. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus*, supervisado por FL.

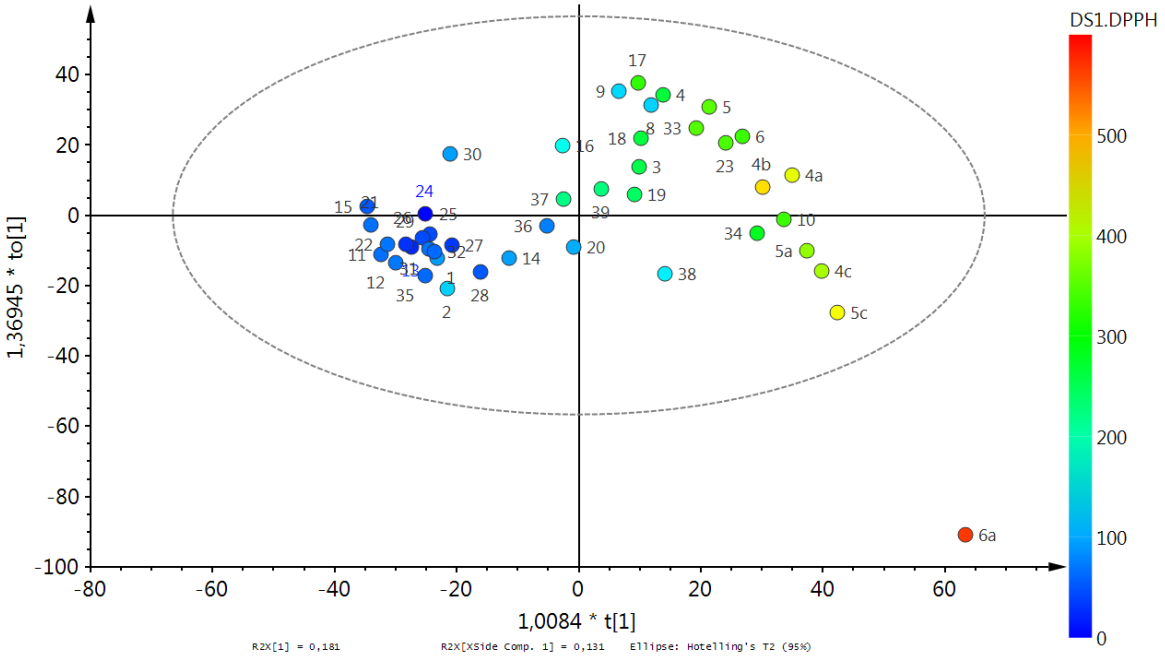


Figura 4.14. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de hojas de especies de *Lupinus*, supervisado por CCRL.

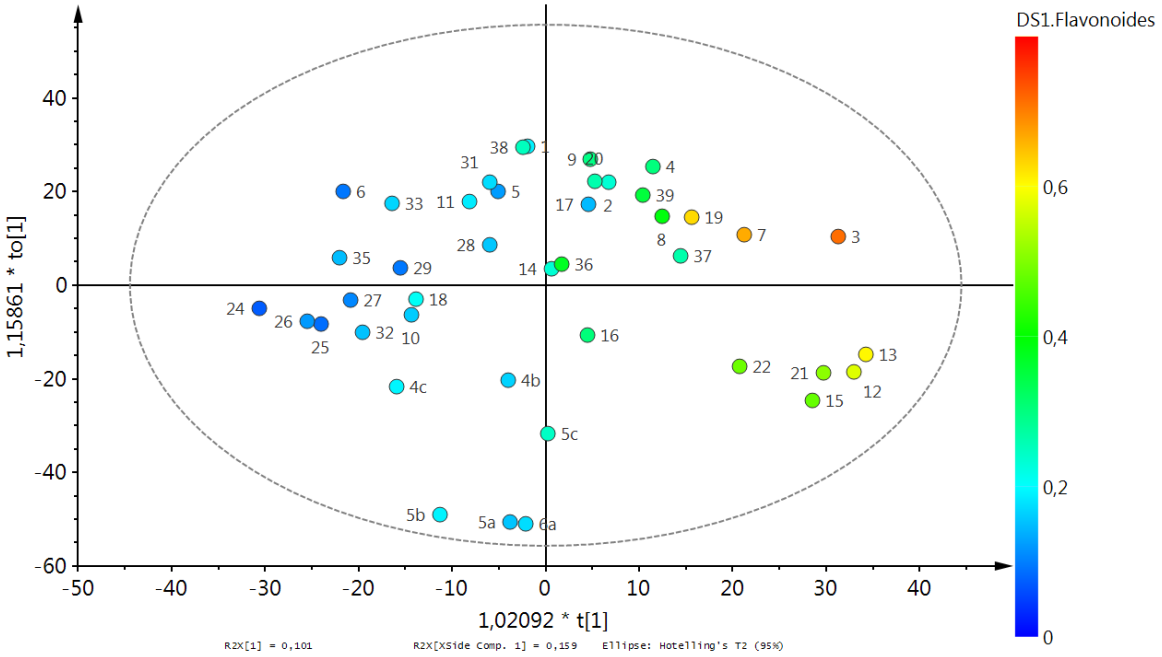


Figura 4.15. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus*, supervisado por FL.

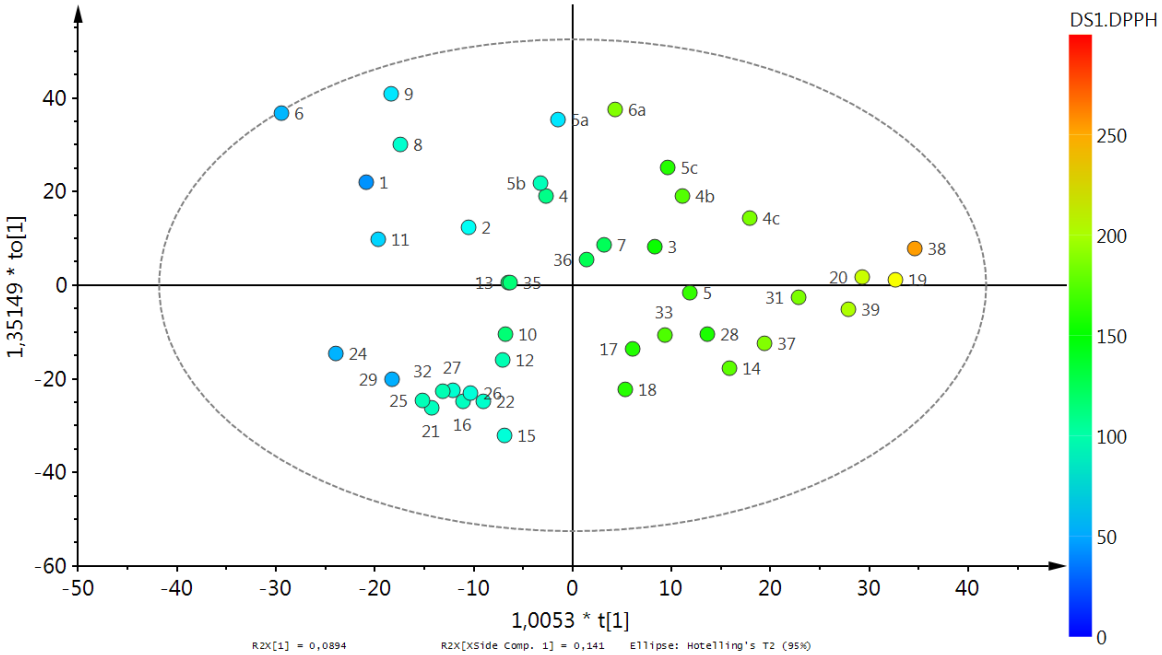


Figura 4.16. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de tallos de especies de *Lupinus*, supervisado por CCRL.

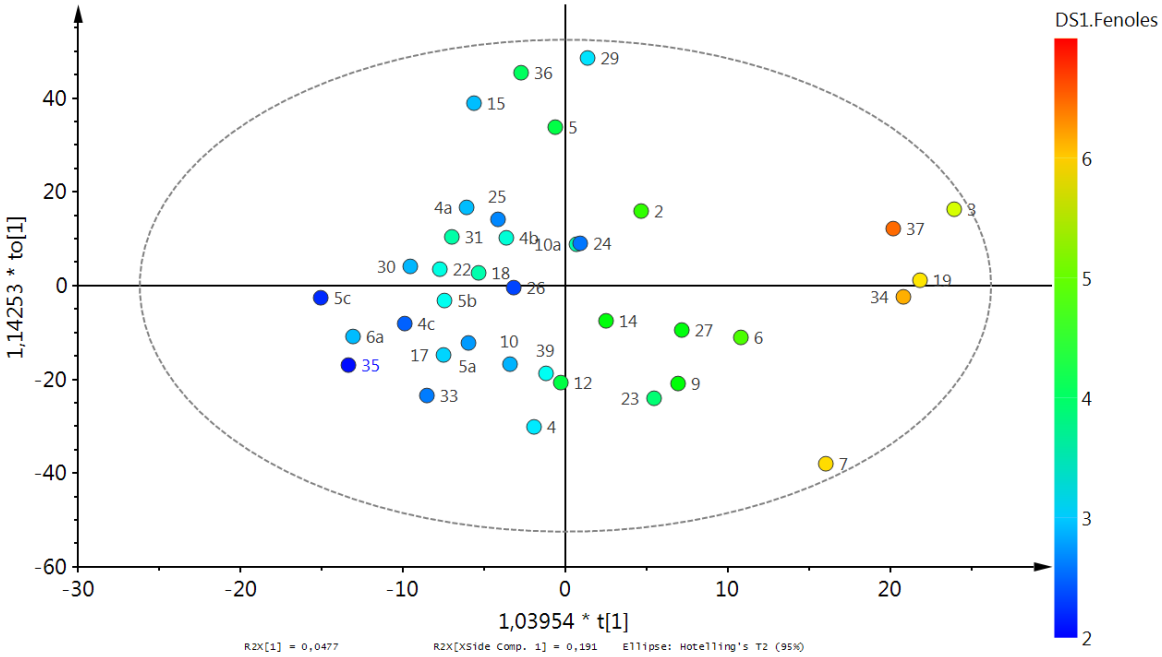


Figura 4.17. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus*, supervisado por CFT

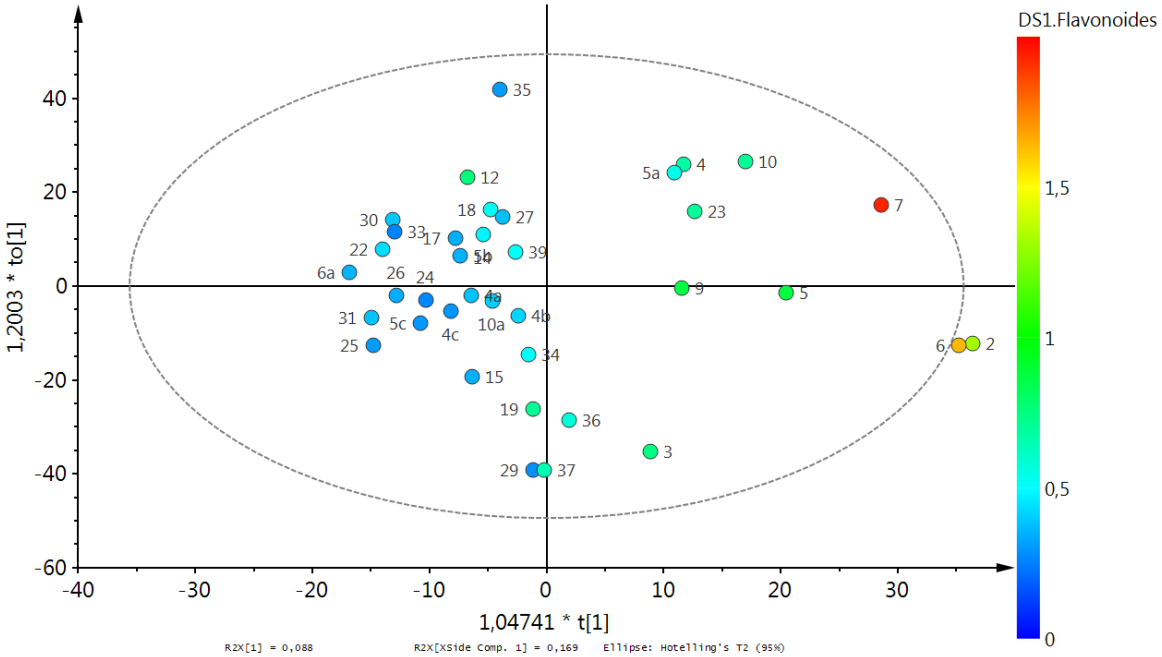


Figura 4.18. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus*, supervisado por FL.

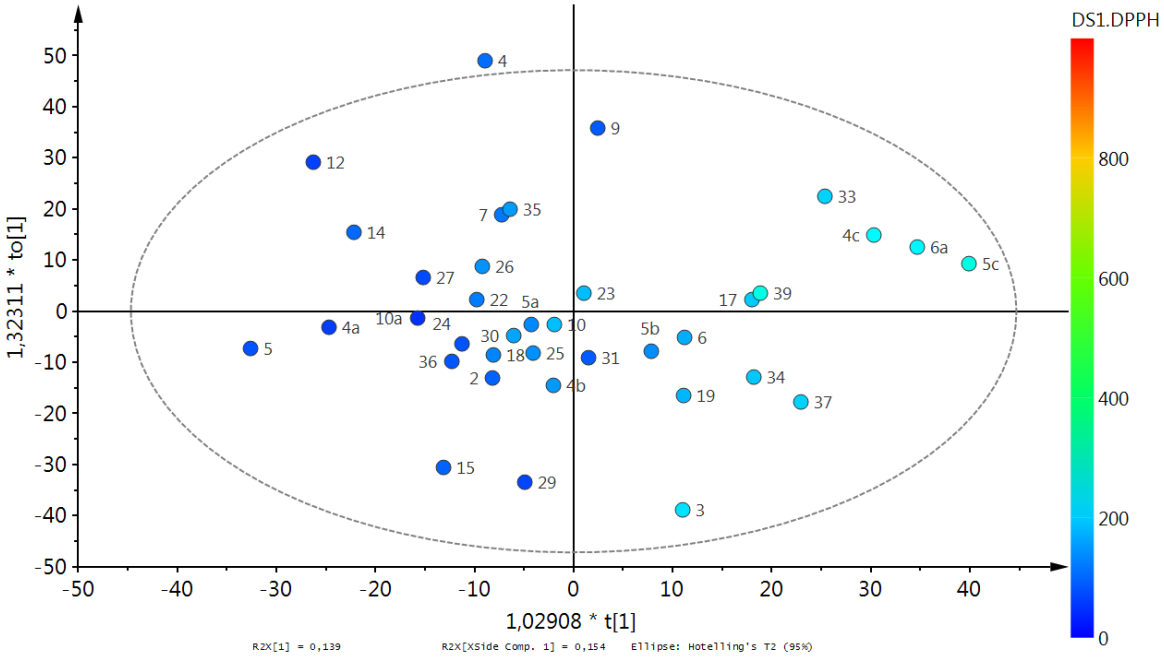


Figura 4.19. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de flores de especies de *Lupinus*, supervisado por CCRL.

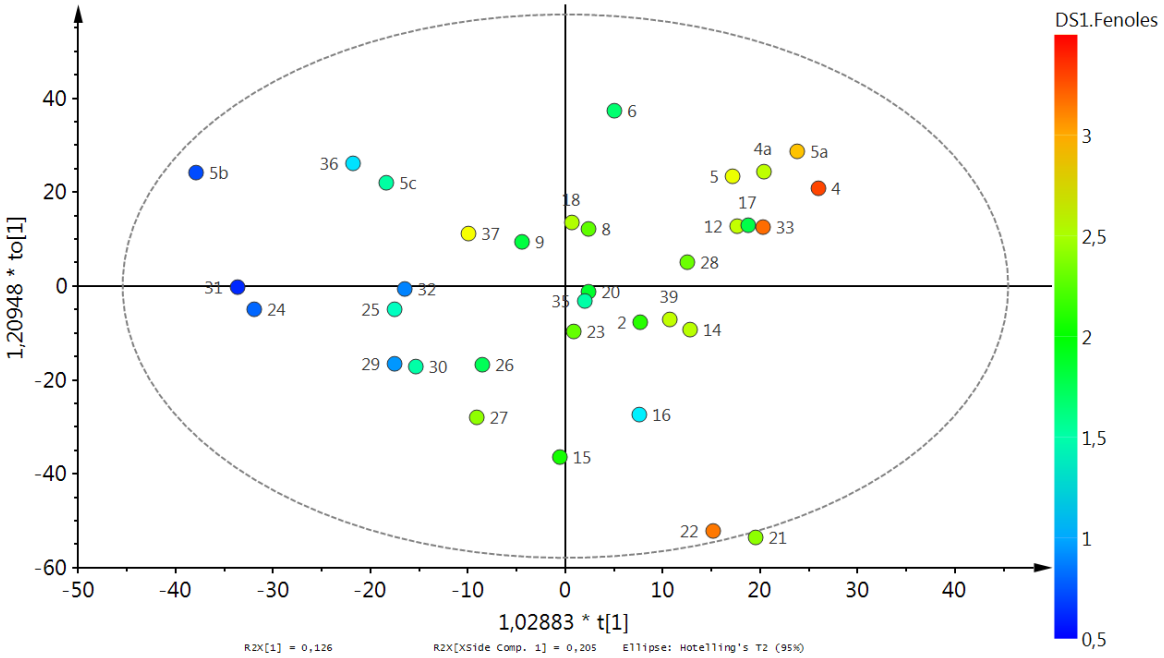


Figura 4.20. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus*, supervisado por CFT.

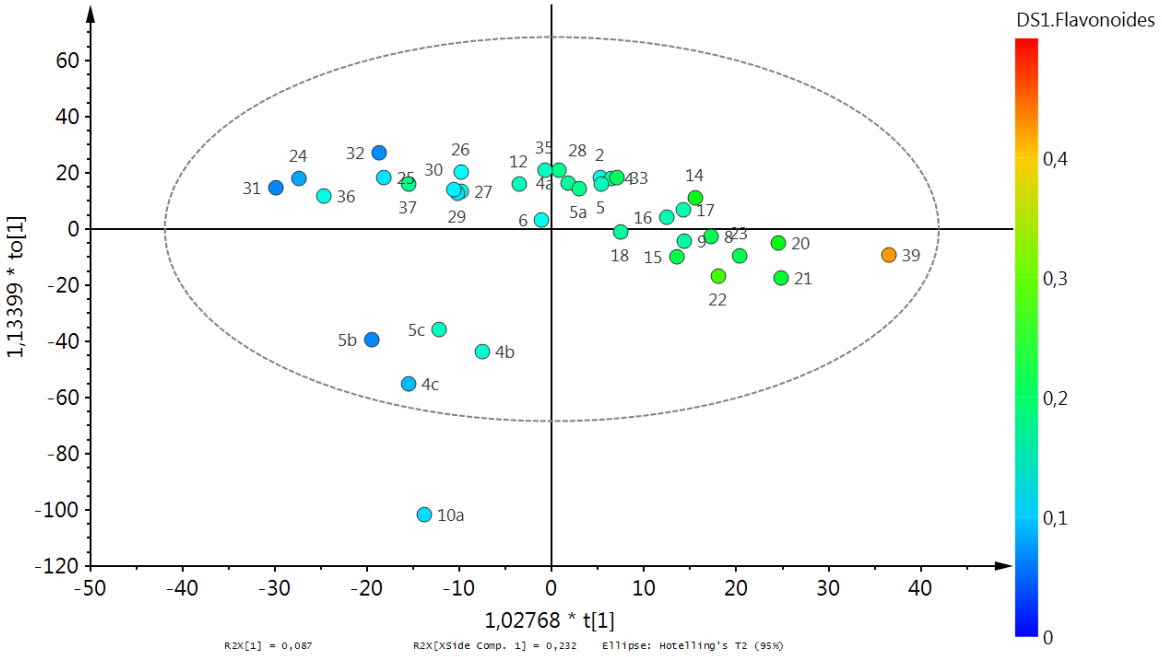


Figura 4.21. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de vainas de especies de *Lupinus*, supervisado por FL.

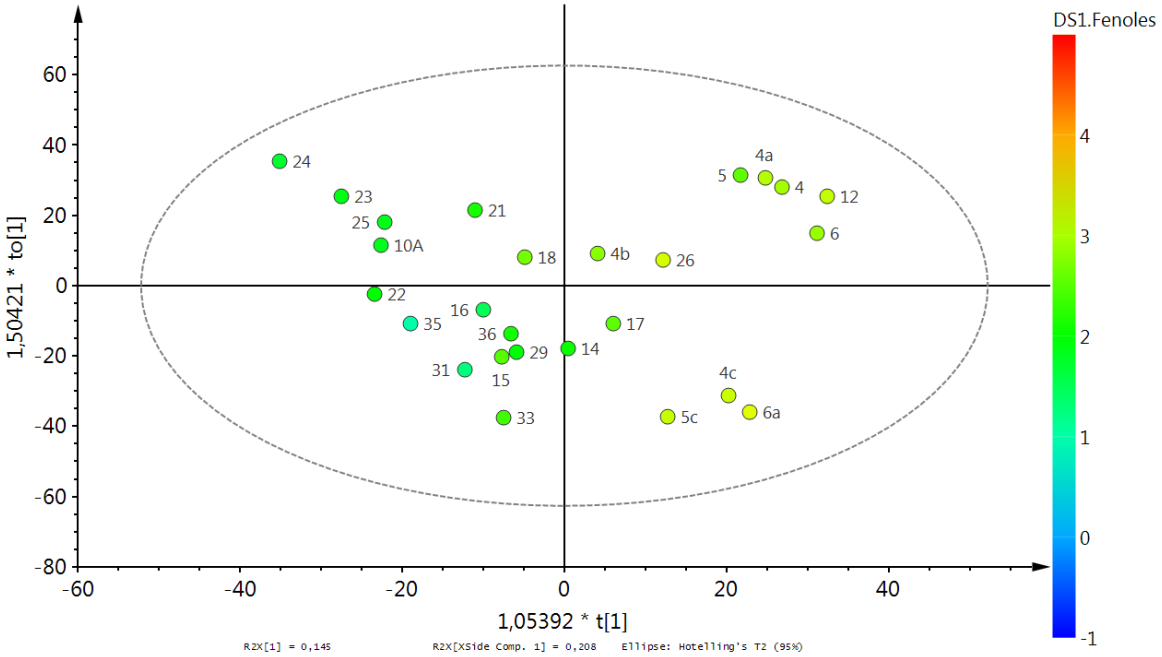


Figura 4.22. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus*, supervisado por CFT.

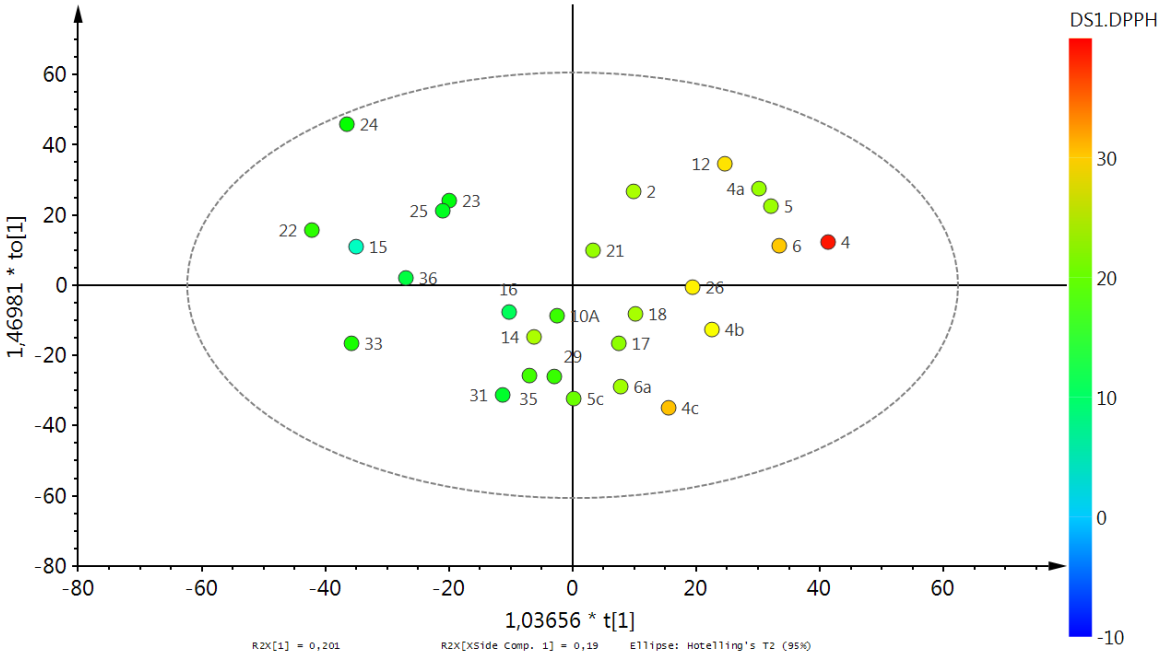


Figura 4.23. Regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales para extractos etanólicos de semillas de especies de *Lupinus*, supervisado por CCRL.