

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante y polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR LA:

**Bach. RIOJAS LOAYZA, Zussety Katherine**

Ayacucho - Perú

2018



A mis padres que han dado todo su apoyo incondicional para que yo pueda cumplir mis sueños y pueda ser cada día mejor persona y profesional y a mis queridos maestros que me han inculcado sus conocimientos y valores.



## **AGRADECIMIENTO**

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme entregado los medios para ser un profesional al servicio de la Salud para la sociedad.

A la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, por su recibimiento y estar pendientes de nuestras necesidades para nuestro crecimiento como profesional.

A los docentes, que con sus enseñanzas, virtudes, experiencias, por inculcarnos valores para ser mejores cada día como profesionales y no perder nuestra ética en ninguna situación dificultosa.

Agradezco a mi asesor Edwin Carlos Enciso Roca por todo su apoyo, enseñanza en todo este periodo de la realización de mi tesis.

A mis familiares y amigos que con su ayuda, motivación han contribuido a que que siga luchando por mis sueños.



## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”	5
2.3. Compuestos fenólicos	7
2.4. Flavonoides	8
2.5. Radicales libres (RL)	10
2.6. Antioxidantes	12
2.7. Método del radical libre radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidraizil (DPPH).	14
2.8. Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 sulfonato de amonio) (ABTS)	15
2.9. Contenido de polifenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar de ejecución	19
3.2. Definición de la población y muestra	19
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	19
3.4. Tipo y diseño de investigación	20
3.5. Análisis de datos	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41



## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Clasificación de antioxidantes según el sitio donde ejerce su acción.	13
Tabla 2.	Clasificación de antioxidantes según su origen.	14
Tabla 3.	Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.	27
Tabla 4.	Determinación del IC <sub>50</sub> en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.	30



## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Estructura química del fenol.	8
Figura 2.	Estructura base de los flavonoides.	9
Figura 3.	Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular.	11
Figura 4.	Sales de hierro generando radicales oxidantes a partir de peróxidos.	11
Figura 5.	Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes.	13
Figura 6.	Reducción del DPPH.	15
Figura 7.	Reducción del ABTS.	16
Figura 8.	Formula estructural del Trolox.	16
Figura 9.	Reacción del reactivo Folin - Ciocalteu.	17
Figura 10.	Porcentaje de la actividad antioxidante por el método de DPPH en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.	28
Figura 11.	Porcentaje de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.	29
Figura 12.	Polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.	31



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de la identificación de la muestra de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	47
Anexo 2. Certificado de la identificación de los ecotipos de las muestras de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	48
Anexo 3. Diagrama de la preparación de la muestra de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	49
Anexo 4. Caracterización fitoquímica.	50
Anexo 5. Preparación de la muestra de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	51
Anexo 6. Ensayo con cloruro férrico en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	54
Anexo 7. Ensayo con Shinoda en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	55
Anexo 8. Ensayo con Baljet en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	56
Anexo 9. Ensayo con Fehling en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	57
Anexo 10. Diagrama del método DPPH.	58
Anexo 11. Diagrama del método ABTS.	59
Anexo 12. Diagrama de la determinación del contenido de polifenoles totales.	60
Anexo 13. Procedimiento de la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho – 2018.	61
Anexo 14. Evaluación de la actividad antioxidante a distintas concentraciones por el método de DPPH en el extracto	63

	hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	
Anexo 15.	Procedimiento de la determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	64
Anexo 16.	Evaluación de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	67
Anexo 17.	Procedimiento de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. “mashua”. Ayacucho - 2018.	68
Anexo 18.	Curva de calibración del DPPH.	70
Anexo 19.	Curva de calibración del ABTS.	71
Anexo 20.	Curva de calibración de polifenoles totales.	72
Anexo 21.	Prueba estadística de ANOVA y Tukey del DPPH.	73
Anexo 22.	Prueba estadística de ANOVA y Tukey del ABTS.	74
Anexo 23.	Prueba estadística de ANOVA y Tukey de polifenoles totales.	75
Anexo 24.	Porcentaje de actividad antioxidante por el método DPPH.	76
Anexo 25.	Porcentaje de actividad antioxidante por el método ABTS.	77
Anexo 26.	Matriz de consistencia.	78

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”, el cual se realizó en los laboratorios de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Salud – UNSCH. Las muestras fueron recolectadas en el distrito de Chiara, provincia de Huamanga, región de Ayacucho, ubicada a 3 515 m. s. n. m. El extracto hidroalcohólico fue obtenido por maceración con alcohol de 80° durante 7 días. La determinación de la actividad antioxidante se realizó mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidraizil (DPPH) y el método de reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 sulfonato de amonio) (ABTS). El contenido de polifenoles totales fue determinado con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante para los ecotipos “yana puca muru”, “yana rosado ñahui” y “qello” con el ensayo de DPPH fueron con  $IC_{50}=127,44$ ; 154,66 y 184,64  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y con el ensayo de ABTS fueron con  $IC_{50}=128,47$ ; 156,20 y 199,52  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Los fenoles totales fueron 121,19; 118,19 y 86,61 mg EAG/100 g de extracto respectivamente. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de los ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua” tienen actividad antioxidante y polifenoles totales.

**Palabras clave:** *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”, actividad antioxidante, polifenoles.



## I. INTRODUCCIÓN

El creciente interés en las últimas décadas sobre el estudio de la capacidad antioxidante de las plantas medicinales y alimenticias se ve aumentado puesto que un número importante de productos son obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante diferentes ensayos in vitro e in vivo asociadas a cada uno de ellos. La mayor parte de las principales enfermedades que provocan la muerte de las personas o deterioran su calidad de vida están provocadas por radicales libres. Cada célula del cuerpo padece unos 10.000 impactos de radicales libres al día.<sup>1</sup>

El oxígeno es esencial para la vida, pero también plantea una paradoja para los organismos aerobios. Este elemento desempeña una función importante comoceptor terminal de electrones durante la respiración celular y constituye lo que se conoce como el "soporte de la vida", pero también es el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como "estrés oxidativo". El desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la defensa antioxidante provoca el estrés oxidativo este se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales dan por resultado el deterioro y muerte celular.<sup>2</sup>

La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente, nos obliga a recurrir a nutrientes que tengan la propiedad de neutralizarlos.<sup>3</sup> Podemos decir que un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción de una molécula inestable, es decir un radical libre, sin perder su propia estabilidad.

El consumo de plantas medicinales y alimenticias ha sido asociado con la protección contra ciertas enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares e incluso cáncer, dicha actividad que se

atribuye a los diferentes antioxidantes contenidos en ellos, como vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, también se debe a otros compuestos tales como los flavonoides (flavonas, isoflavonas, catequinas) que son componentes que se consumen en la dieta y, que manifiestan una fuerte capacidad antioxidante. Es por esta razón que resulta importante determinar la capacidad antioxidante de las diferentes plantas medicinales y alimenticias.<sup>4</sup>

La mashua comparado con la papa, el melloco, y la oca presenta una mayor capacidad antioxidante, con alto contenido de antocianinas y carotenoides. Atributos que hacen de la mashua un cultivo con un gran potencial, y que podría ser utilizado en la mejora para la resistencia a plagas, la industria farmacéutica y en la nutrición.<sup>5</sup>

**Objetivo General:**

- Determinar la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”.

**Objetivos Específicos:**

- Identificar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”.
- Comparar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tuberculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua” con el estándar trolox.
- Comparar el contenido de polifenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

Beltrán, Mera.<sup>6</sup> Realizó la investigación: Elaboración del tubérculo mashua (*Tropaeolum tuberosum*) troceada en miel y determinación de la capacidad antioxidante. La actividad antioxidante se determinó mediante el método de reacción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), mediante el método espectrofotométrico. Para evaluar la actividad antioxidante de la muestra mashua se la sometió a una operación unitaria de secado en la estufa con temperatura de 37 grados centígrados hasta alcanzar un peso constante, para posteriormente por determinaciones técnicas y ensayos espectrofotométricos determinar su capacidad antioxidante; introduciéndose además el parámetro llamado eficiencia antioxidante (AOE). La capacidad antioxidante equivalente al trolox obtenida fue de 17, 87  $\mu\text{mol/g}$ , aplicando el ensayo DPPH. Se concluye que: tanto técnica como experimentalmente que el tubérculo mashua (*Tropaeolum tuberosum*) posee importantes nutrientes y antioxidantes capaz de solucionar los problemas de desnutrición de los niños y puede alargar el promedio de vida en el ser humano.

Betalleluz *et al.*<sup>7</sup> Demostraron el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos de la mashua, al retardar la oxidación del aceite de soya, durante el almacenamiento acelerado y la fritura. La eficacia de estos polifenoles fue casi igual o incluso mejor que los resultados obtenidos con antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y la terbutilhidroquinona (TBHQ). La extracción con acetato de etilo fue la más conveniente para la recuperación de los antioxidantes fenólicos que pueden ser incorporados fácilmente en aceites y protegerlos de la oxidación.

Chirinos *et al.*<sup>8</sup> Identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos no antociánicos. Los compuestos encontrados en los diferentes genotipos fueron: ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, derivados de epigalocatequina y

procianidina B2, diferentes derivados de ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico y derivados de miricetina y/o rutina. Las proantocianidinas contribuyeron significativamente a la actividad antioxidante total, pero otros compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, monómeros de flavan-3-oles, flavonoles y antocianinas también contribuyeron en la capacidad antioxidante de este tubérculo. El estudio sugiere que los compuestos fenólicos de la mashua proveen de una excelente actividad antioxidante en la dieta y pueden ofrecer un potencial efecto contra la oxidación lipídica, lo cual podría ser explotado por la industria alimentaria y cosmética.

Campos *et al.*<sup>9</sup> Señalan que en el estudio realizado los genotipos de mashua de color púrpura, presentaron alto contenido de compuestos fenólicos totales, mientras que los genotipos de mashua color amarillo presentaron bajo contenido. Las antocianinas totales del genotipo de mashua pigmentadas se encuentran en el rango de 0,5 a 2,05 mg/g, encontrándose este resultado dentro de lo reportado para las fresas, 1,38 – 3,85 mg/g. De otro lado, mencionan que los tubérculos de mashua contienen carotenoides totales que se encuentran en el rango de 1 a 25  $\mu\text{g}$   $\beta$ -caroteno/g. Los contenidos de carotenoides de los tubérculos de mashua son relativamente elevados comparados con la papa comercial y papas nativas, también es comparado con el contenido en papaya (4,08  $\mu\text{g/g}$ ). Sin embargo, el contenido de carotenoides de mashua es reducido respecto a tomate (56 – 210  $\mu\text{g/g}$ ), mango (74,3  $\mu\text{g/g}$ ) y zanahoria (90  $\pm$  16  $\mu\text{g/g}$ ).

Inostroza *et al.*<sup>10</sup> Realizaron la investigación: Actividad antioxidante de *tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) y su aplicación como colorante para yogur. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antioxidante y uso del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) como colorante para yogur. La actividad antioxidante fue determinada por los métodos DPPH y ABTS. El contenido total de antocianinas (AT) y polifenoles (PT) fue determinado por el método de pH diferencial y Folin-Ciocalteu, respectivamente.

Pacco E.<sup>11</sup> Realizó la investigación: Evaluación del efecto del soleado y la cocción en la capacidad antioxidante del puré deshidratado de mashua (*tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón). El objetivo fue determinar los parámetros del tiempo de soleado, tiempo y temperatura de cocción en la estabilidad de los compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante del puré deshidratado de mashua.

Córdova, C.<sup>12</sup> Realizó estudios de evaluación del contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de la mashua, muestra los diferentes cambios que se puede suscitar en la mashua morada al ser sometida a un proceso soleado por un período de siete días. Sus resultados evidencian que el soleado ejerce un efecto significativo sobre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante, disminuyendo y aumentando los valores de dichas variables después de siete días de soleado, respectivamente. Sin embargo, no encontró un efecto significativo del proceso de soleado sobre el contenido de compuestos fenólicos.

Morales N.<sup>13</sup> Evaluó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro ecotipos del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. "mashua", al comparar la actividad antioxidante con la vitamina C, el ecotipo "oqe" demostró ser la mejor antioxidante, estadísticamente a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) que existe una diferencia significativa antioxidante de los ecotipos y el estándar.

## **2.2. *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua"**

### **2.2.1. Clasificación Taxonómica** (Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988)

<b>DIVISIÓN</b>	:	MAGNOLIOPHYTA
<b>CLASE</b>	:	MAGNOLIOPSIDA
<b>SUB CLASE</b>	:	ROSIDAE
<b>ORDEN</b>	:	GERANIALES
<b>FAMILIA</b>	:	TROPAEOLACEAE
<b>GÉNERO</b>	:	<i>Tropaeolum</i>
<b>ESPECIE</b>	:	<b><i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P.</b>
<b>N.V</b>	:	"mashua".

Fuente: Constancia expedida por Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 1).

**ECOTIPOS** : "yana puca muru", "yana rosado ñahui", y "qello".

Fuente: Constancia expedida del Departamento Académico de Agronomía y Zootecnia (Anexo 2).

### **2.2.2. Descripción Botánica**

La mashua es una planta herbácea perenne trepadora, glabra de 20-80 cm de alto, de crecimiento inicialmente erecto, que luego varía a semipostrado y es ocasionalmente trepador, mediante pecíolos táctiles<sup>14</sup> con un follaje que puede

variar de verde amarillento a verde oscuro. Sus tallos aéreos son cilíndricos de 3-4 mm de grosor, ramificados y pueden variar de color de verde a púrpura grisáceo con diferentes grados de pigmentación. Las hojas son alternas separadas por entrenudos de 1-8 cm con pecíolo de 2-30 cm de longitud. Las láminas son peltadas de 5-6 cm de ancho, tri o pentalobadas, también se puede observar en una misma planta hojas tri y pentalobadas. La base de la lámina es truncada en la base. Las hojas son verde oscuras, brillantes en el haz y más claras en el envés.<sup>15</sup>

Las flores solitarias aparecen sobre pedúnculos de 10-15 cm, intensamente pigmentados. Son zigomorfas de 2-2.5 cm de longitud. El cáliz de color rojo intenso tiene cinco sépalos unidos en su base, los tres sépalos superiores se prolongan en un espolón de 1-1.5 cm de longitud. La corola es de cinco pétalos rojo anaranjados y provistos de una nervadura roja oscura, los dos pétalos superiores son orbiculares de 5-8 mm de diámetro y los inferiores son espatulados de 10-12 mm de longitud.<sup>15</sup> El color de las flores va desde un color amarillo oscuro, anaranjado y escarlata.<sup>16</sup> El fruto es un esquizocarpo, formado de tres mericarpos uniseminados indehiscentes. La semilla botánica es viable.<sup>17</sup>

El color que presentan es variado, según los descriptores de mashua<sup>15</sup> existen al menos nueve colores: blanco amarillento, amarillo pálido, amarillo, amarillo naranja, naranja, rojo grisáceo, rojo grisáceo oscuro, púrpura grisáceo y negro, siendo dominante el amarillo con ojos negruzcos o anaranjados. También son comunes los tubérculos con fondo claro con color secundario, distribuido en los ojos y bandas irregulares o también en forma de puntos densos o manchas irregularmente distribuidos. Los ojos de la mashua son siempre profundos, anchos y estrechos, sin brácteas.<sup>15</sup>

### **2.2.3. Hábitat y Distribución Geográfica**

La primera evidencia arqueológica de la mashua data en los años 650-1350 después de Cristo en los sedimentos de la cueva Huachumachay, localizada en el valle de Jauja-Perú. Asimismo, en cerámicas de la cultura Nazca se encontró representaciones de mashua en el año 1000 después de Cristo, entre otras tuberosas andinas (papa, oca y olluco).<sup>12</sup>

Los tubérculos comestibles de mashua se cultivan en áreas pequeñas en sistemas agrícolas tradicionales y en condiciones marginales, en todos los países Andinos, principalmente en Perú, Ecuador y Bolivia. El rango latitudinal del cultivo de mashua en los andes es de 8 ° N y 24 ° S, y la altitud varía desde

2400 hasta 4300 m.s.n.m, con la más frecuente ocurrencia entre 3000 y 3700 m.s.n.m, donde las temperaturas medias anuales están en el rango de 8-11 °C.<sup>12</sup>

#### **2.2.4. Composición química**

El tubérculo posee una textura arenosa con un alto porcentaje de carbohidratos y agua. El contenido de agua de los tubérculos de mashua va desde 79 hasta 94 por ciento. Los tubérculos secos pueden contener desde 14 por ciento hasta 16 por ciento de proteína, casi el 80 por ciento de carbohidratos, alrededor de 9 µg/100g β-caroteno, y casi 480 mg de vitamina C/100g.<sup>16</sup> Además, contiene isotiocianatos, los cuales son usados en etnomedicina, compuestos fenólicos, antioxidantes como la vitamina C, caroteno, flavonoides y antocianinas.<sup>17</sup> Los glucosinolatos son metabolitos secundarios, responsables del sabor picante y aroma sulfuroso de algunas plantas, que produce, como resultado, el rompimiento en isotiocianatos.

Además, la composición se ve afectada por varios factores como: variedad, zonas de crecimiento, formas de cultivo, almacenamiento, madurez de cosecha etc. La mashua pueden contener apreciables cantidades de carotenos (vitamina A) y de vitamina C (77 mg en 100 gramos de materia fresca comestible), siendo cuatro veces más que la cantidad de esta vitamina encontrada en la papa.<sup>18</sup>

#### **2.2.5. Formas de utilización**

Algunos usos de tubérculo de mashua son:

Alimento: Los tubérculos se consumen cocidos. Los brotes tiernos y las flores se comen cocidos como verduras.

Medicinal: Contra los cálculos renales.

Antibiótico: Contra *Cándida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus*, muy buena contra las dolencias genito urinarias.

Antiafrodisíaco: Disminuye la cantidad de testosterona y dihidrotestosterona en la sangre. Se dice que reduce el instinto sexual y se cuenta que las tropas de los incas llevaban la mashua como fiambre para olvidarse de sus mujeres.<sup>19</sup>

### **2.3. Compuestos Fenólicos**

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina<sup>20</sup>, por lo que las plantas presentan

un gran número de componentes fenólicos (e.g., flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc).<sup>21</sup>

Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 800 compuestos distintos. Actualmente se ha despertado un gran interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio.<sup>22</sup>

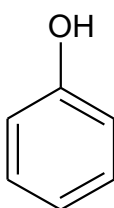


Figura 1: Estructura química del fenol.

### 2.3.1. Mecanismo antioxidante de los ácidos fenólicos

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parecer estar relacionado con su actividad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también puede promover reacción de oxidación *in vitro*.

La captación de los radicales, depende de la estructura química de la molécula, ya que, el especial determinante es el número y la localización de los grupos hidroxilos donadores de electrones, al ceder un electrón al radical libre, la molécula se queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización de los dobles enlaces.<sup>22</sup>

### 2.4. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta.<sup>23</sup>

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.<sup>24</sup> Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma).<sup>25</sup>

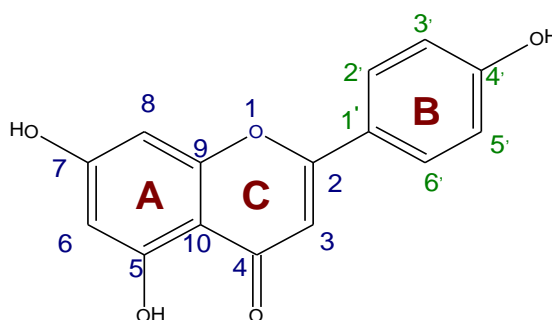


Figura 2: Estructura base de los flavonoides.

#### 2.4.1 Acción antioxidante de los flavonoides

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres.<sup>26</sup> Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras

actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas<sup>27</sup>, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria.

## 2.5. Radicales libres (RL)

Se consideran RL aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que contrario a la normal tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de parejas es desapareado. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos.<sup>28</sup>

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular. Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante.<sup>29</sup>

### 2.5.1 Formación de los radicales libres

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical OH que es generado siempre que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entra en contacto con iones cobre (Cu<sup>+2</sup>) o iones hierro (Fe<sup>+2</sup>); ya que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los complejos metálicos están presentes en humanos, es lógico asumir que el OH puede ser formado *in vivo*.<sup>29</sup>

Los radicales libres se forman por fuentes exógenas o endógenas:

**Fuentes endógenas:** Podemos distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de los agentes oxidantes producidos por las células:

- En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O<sub>2</sub> reduciéndolo en varias etapas a H<sub>2</sub>O. Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>·</sup>.

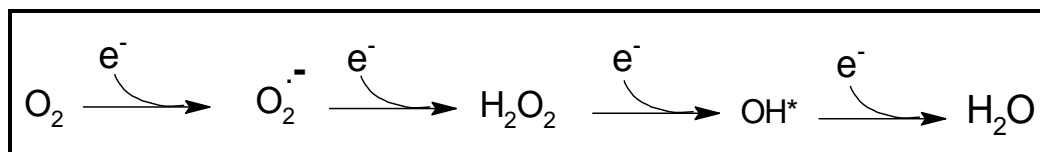


Figura 3. Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular.<sup>30</sup>

- Las células fagocíticas (leucocitos, neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo (literalmente una “explosión” oxidativa) en el que se producen grandes cantidades de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$ . Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer.
- Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas produce,  $H_2O_2$  como subproducto, que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, algunos de los peróxidos escapan la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN.
- Las enzimas del complejo Citocromo P450, son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN.<sup>30,31</sup>

**Fuentes exógenas:** Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan:

- Los óxidos de nitrógeno del humo de tabaco.
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos.

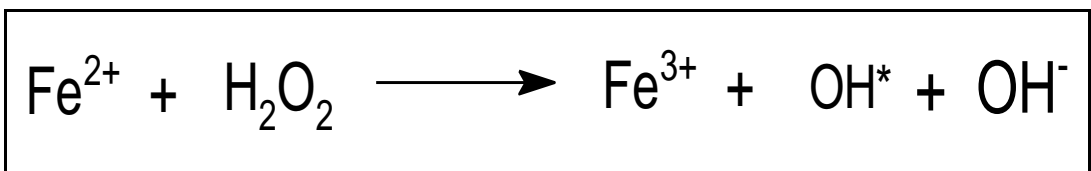


Figura 4. Sales de hierro generando radicales oxidantes a partir de peróxidos.<sup>30</sup>

- Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.<sup>30,31</sup>

## 2.6. Antioxidantes

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Estos pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o por mecanismos que no estén

relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios.

Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de un cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de la radiación UV o desactivación del oxígeno singulete. Normalmente, los antioxidantes secundarios solo poseen actividad antioxidante en presencia de un segundo componente minoritario, lo cual puede observarse en el caso de agentes secuestradores, tal como el ácido cítrico, que sólo es efectivo en presencia de iones metálicos, y agentes reductores tal como el ácido ascórbico que sólo es efectivo en presencia de tocoferoles u otros antioxidantes primarios.<sup>32</sup>

### 2.6.1. Los productos naturales como los antioxidantes

Las investigaciones de la actividad antioxidante de varias fuentes naturales demuestran que son eficaces y seguros, así extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos despiertan un interés en la industria alimenticia porque retardan la degradación oxidativa de lípidos y mejoran las cualidades de los alimentos. Además, se están estableciendo metodologías de extracción, identificación de compuestos activos, y evaluación de su eficacia de estos compuestos activos en la oxidación de aceites y alimentos, constatándose que la capacidad antioxidante de una fuente natural es influenciada por diferentes factores como: región en donde la planta es cultivada, el solvente o técnica de extracción empleados, o el sustrato lipídico utilizado en el ensayo.<sup>33</sup>

### 2.6.2. Mecanismo de acción de los antioxidantes

Uno de los mecanismos de acción de los antioxidantes presentes en el cuerpo es aquél en que la molécula de antioxidante, al colisionar con un radical libre de oxígeno, le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un radical libre de oxígeno débil no tóxico.<sup>34</sup>

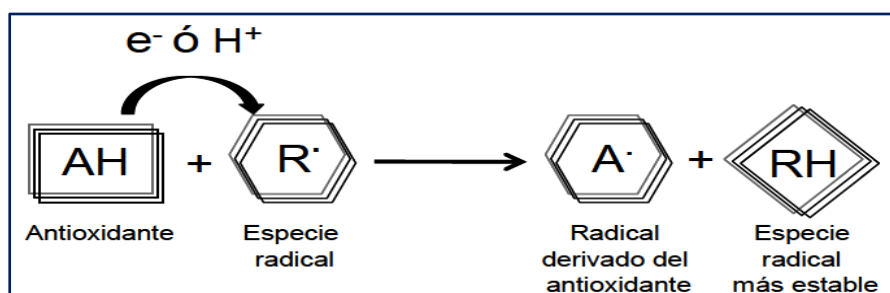


Figura 5. Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes.<sup>31</sup>

### 2.6.3. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (tabla 1). La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas lípidos, proteínas, ADN, etc. Funcionalmente vitales o más importantes.<sup>35</sup> Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos (tabla 2).<sup>36</sup>

**Tabla 1: Clasificación de antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.**<sup>36</sup>

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

**Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes, según origen.**<sup>36</sup>

Origen	Acción
<b>1. Exógenos</b>	
<b>Vitamina E</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neutraliza el oxígeno singlete</li> <li>- Captura radicales libres hidroxilo</li> <li>- Captura O<sub>2</sub></li> <li>- Neutraliza peróxidos</li> </ul>
<b>Vitamina C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neutraliza el oxígeno singlete</li> <li>- Captura radicales libres de hidroxilo</li> </ul>

	- Captura O <sub>2</sub> - Regenera la forma oxidada de la vitamina E
<b>Betacarotenos</b>	Neutraliza el oxígeno singlete
<b>Flavonoides, Licopenos</b>	
<b>2. Endógenos</b>	
<b>Enzimáticos</b>	Cofactor
<b>Superóxido dismutasa (SOD)</b>	Cobre, sodio, manganeso
<b>Catalasa (CAT)</b>	Hierro
<b>Glutación peroxidasa (GPx)</b>	Selenio
<b>3. No enzimáticos</b>	
<b>Glutación</b>	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
<b>Coenzima Q</b>	
<b>Ácido Tioctico</b>	Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)

---

### **2.7. Método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidraizil (DPPH)**

Este método fue propuesto por Blois en 1958 en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno (H) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe a 517 nm o 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos

requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido, sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado.<sup>37</sup>

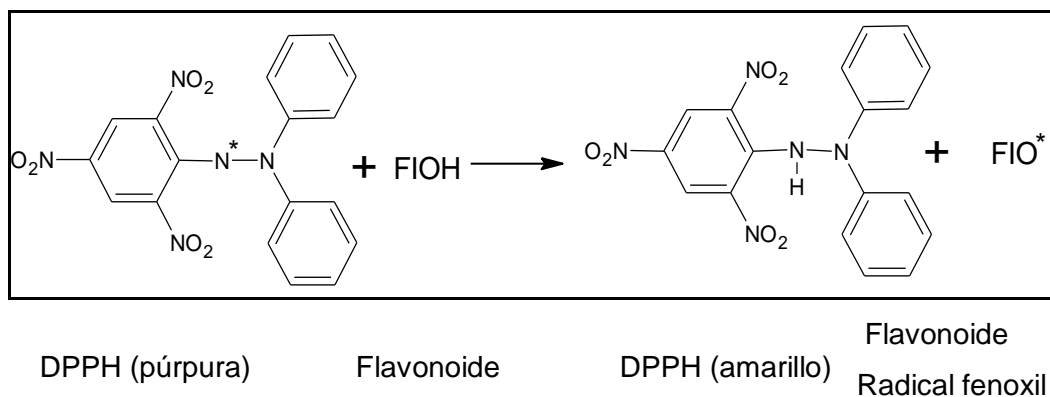


Figura 6: Reducción del DPPH.

### 2.8. Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 sulfonato de amonio) (ABTS)

La generación del radical ABTS constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes.

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS, implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

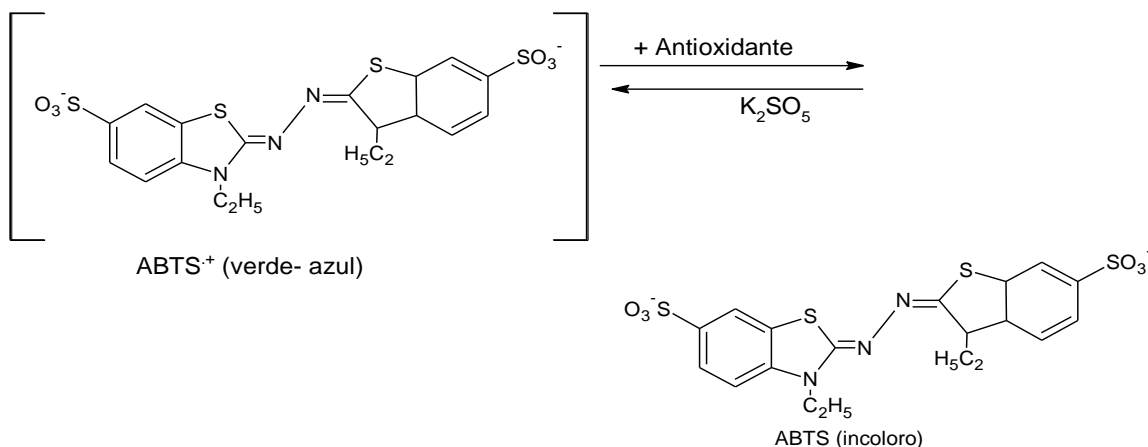


Figura 7: Reducción del ABTS.

### Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico)

Es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño celular. El compuesto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico, Trolox es un análogo soluble en agua de la vitamina E, que se puede comparar con varios antioxidantes comerciales.<sup>39</sup>

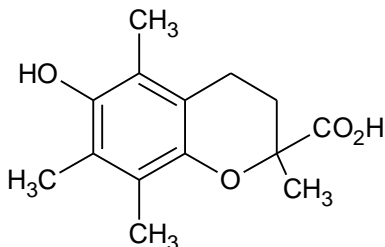


Figura 8: Fórmula estructural del Trolox.

### 2.9. Contenido de polifenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Consiste en una reacción entre el reactivo Folin-Ciocalteu activado con carbonato de sodio. El conjunto de los compuestos fenólicos de la muestra se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se reduce dando una mezcla de óxido de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y óxido de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) de color azul. La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm.<sup>40</sup>

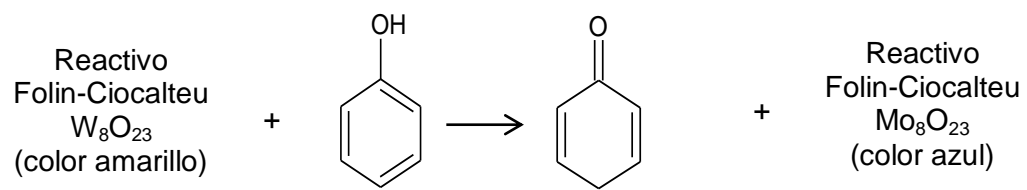


Figura 9: Reacción del reactivo Folin-Ciocalteu.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de mayo a setiembre del 2018.

#### **3.2. Definición de la población y muestra**

##### **3.2.1 Población**

La población está constituida por tres ecotipos: “yana rosado ñahui”, “yana puca muru” y “qello” del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”, que se recolectaron del distrito de Chiara, provincia de Huamanga, región de Ayacucho, ubicada a 3 515 m. s. n. m.

##### **3.2.2 Muestra**

Constituida por 6 kg de tubérculo de tres ecotipos: “yana rosado ñahui”, “yana puca muru” y “qello” del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”.

#### **3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos**

##### **3.3.1. Recolección e identificación de la muestra**

Se recolectaron del distrito de Chiara, provincia de Huamanga, región de Ayacucho, ubicada a 3 515 m. s. n. m., teniendo en cuenta que el tubérculo se encuentre en buen estado, los cuales fueron limpiados, secados y guardados en bolsas de tela de color oscuro y cartones para evitar su descomposición.

La muestra recolectada fue trasladada a los Laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga donde fueron trasladados para su conservación.<sup>41</sup>

Se procedió a la identificación botánica de los tubérculos por la especialista del herbario Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, la bióloga Laura Aucasime Medina (Anexo N° 01) y a la identificación de cada ecotipo por el especialista de la

cátedra de producción y manejo de semillas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el ingeniero agrónomo Rolando Bautista Gómez (Anexo N° 02).

### **3.3.2. Preparación de la muestra**

6 kg de los tres ecotipos: “yana rosado ñahui”, “yana puca muru” y “qello” del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua” se limpiaron, trozados en forma transversal hasta obtener láminas delgadas, luego se secaron a la sombra y se colocaron en una fuente de vidrio, se procedió a colocar en una estufa a 40 °C hasta desecación. Una vez seca las muestras se procedieron a moler hasta su trituración y finalmente fueron almacenadas en un frasco de color ámbar<sup>42</sup> (Anexo N° 03).

### **3.3.3. Obtención del extracto hidroalcohólico**

De la muestra seca y pulverizada se tomó 200 g de cada uno de los tres ecotipos de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”, se maceró utilizando medio litro de etanol al 80 % en un recipiente de vidrio color ámbar durante una semana agitándole periódicamente a temperatura ambiente, luego las muestras maceradas se procedieron a filtrar con papel Whatman N°40 y finalmente se concentraron en el rotavapor a una temperatura de 50 °C hasta su sequedad en una estufa a una temperatura a 40 °C<sup>42</sup> (Anexo N° 03).

### **3.3.4. Tamizaje fitoquímico**

La caracterización fitoquímica se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificar el comportamiento químico frente a reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración al extracto hidroalcohólico de tres ecotipos: “yana puca muru”, “yana rosado ñahui” y “qello” del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua” que se fundamentarán en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas<sup>43</sup> (Anexo N° 04).

## **3.4. Tipo y diseño de investigación:**

### **3.4.1. Determinación de la actividad antioxidante**

#### **3.4.1.1 Método del radical libre 2,2– difenil-1-picrilhidraizil (DPPH)**

Se utilizó el procedimiento descrito por Bran Williams con ajustes descrito por Thaipong *et al.*<sup>44</sup>

#### **Preparación de la solución patrón (SP) y de la solución de trabajo (ST)**

- Solución patrón (SP): se pesó 24 mg del reactivo DPPH y fueron disueltos en un volumen de 10 mL con agua destilada, se almacenó en refrigeración.
- Solución de trabajo (ST): se tomó 10 mL de SP y se adicionó 45 mL de etanol (EtOH), se hizo la lectura a 515 nm y se ajustó hasta una absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  con etanol.

#### **Preparación de la recta de calibración**

Se realizó una solución patrón a una concentración de 12,5 mg de Trolox y se aforó a 50 mL con etanol. A partir de la solución patrón se realizó diluciones de 0,5; 1; 2; 3; 4 mL y se aforó a 10 mL de etanol, se agitó por cinco minutos. Las diluciones se prepararon por triplicado. Se siguió con el procedimiento de la muestra.<sup>45</sup>

#### **Preparación de muestra**

Se tomó 300  $\mu$ L de muestra y se adicionaron 2700  $\mu$ L de ST, se dejó reaccionar por media hora en oscuridad y se procedió a leer la absorbancia a 515 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado<sup>44</sup> (Anexo N° 10).

#### **Cálculos:**

$$\%AA = 100 - \frac{(Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

#### **Dónde:**

% AA: Porcentaje de la actividad antioxidante

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco

Ac: Absorbancia del blanco del reactivo

#### **3.4.1.2. Método reacción con el radical 2,2'azino-bis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)**

##### **Preparación de la solución patrón (SP) y de la solución de trabajo (ST)**

Se utilizó el procedimiento descrito por Arnao con ajustes descrito por Thaipong *et al.*<sup>44</sup>

- Solución 1: se pesó 0,0406 g del reactivo ABTS y fueron disueltos en un volumen de 10 mL con agua destilada.
- Solución 2: se pesó 0,007 g de persulfato potásico ( $K_2S_2O_8$ ) y se disolvieron a un volumen de 10 mL con agua destilada.

- Se mezclaron las soluciones 1 y 2, se dejó reposar por doce horas en oscuridad y esta fue la solución patrón (SP).
- Solución de trabajo (ST): se mezcló 1 mL de SP con 60 ml de etanol (EtOH), se hizo la lectura a 734 nm y se ajustó hasta una absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  medida en cubetas.

#### **Preparación de la recta de calibración**

Se realizó una solución patrón a una concentración de 12,5 mg de Trolox y se aforó a 50 mL con etanol. A partir de la solución patrón realizará diluciones de 0,5; 1 ; 2 ; 3; 4 mL y se aforó a 10 mL de etanol. Las diluciones se prepararon por triplicado. Se siguió con el procedimiento de la muestra.

#### **Preparación de muestra**

Se tomó 300  $\mu$ L de muestra + 2700  $\mu$ L de ST ABTS, se dejó reaccionar por dos horas en oscuridad y se procedió a hacer la lectura de la absorbancia a 734 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado<sup>44</sup> (Anexo N° 11).

#### **Cálculos:**

$$\%AA = 100 - \frac{(Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

#### **Dónde:**

% AA: Porcentaje de la actividad antioxidante

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco

Ac: Absorbancia del blanco del reactivo

#### **3.4.1.3. Evaluación de la cuantificación de polifenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu**

Se utilizó el procedimiento descrito por Arnao con ajustes descrito por Thaipong *et al.*<sup>44</sup>

#### **Preparación de la recta de calibración:**

Se realizó una solución patrón a una concentración de 50 mg de ácido gálico y se aforó a 25 mL con etanol. A partir de la solución patrón se realizaron diluciones de 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mL y se aforó a 10 mL de etanol. Las diluciones se prepararon por triplicado. Se siguió con el procedimiento de la muestra.

#### **Preparación de la muestra**

Para la preparación de la muestra se tomó 300  $\mu\text{L}$  de muestra y se adicionó 2400  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se agregó 150  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu a 0,25 N, se agitó por cinco minutos, se dejó reaccionar por tres minutos y se procedió a adicionar 300  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 1 N y se incubó a temperatura ambiente por dos horas, se hicieron las lecturas a la absorbancia a 725 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado<sup>45</sup> (Anexo N° 12).

### **3.5. Análisis de datos**

Los resultados de la actividad antioxidante fueron representados en forma de gráfico de barras. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) y como método de comparación entre los tratamientos se realizó la prueba de Tukey.



## **IV. RESULTADOS**



Tabla 3: Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”. Ayacucho – 2018.

METABOLITOS SECUNDARIOS	Resultados/Ecotipos			Observaciones
	Yana puca muru	Yana rosado ñahui	Qello	
<b>Fenoles</b>	++	+++	+	Formación de coloración oscura
<b>Flavonoides</b>	++	++	+	Formación de coloración carmelita y rojo
<b>Azucares reductores</b>	+++	+++	+++	Formación de precipitado rojo ladrillo
<b>Cumarinas y lactonas</b>	++	++	+	Formación de coloración roja

LEYENDA:

- (+) : Poco / débil  
 (++) : Moderado  
 (+++) : Abundante / intenso

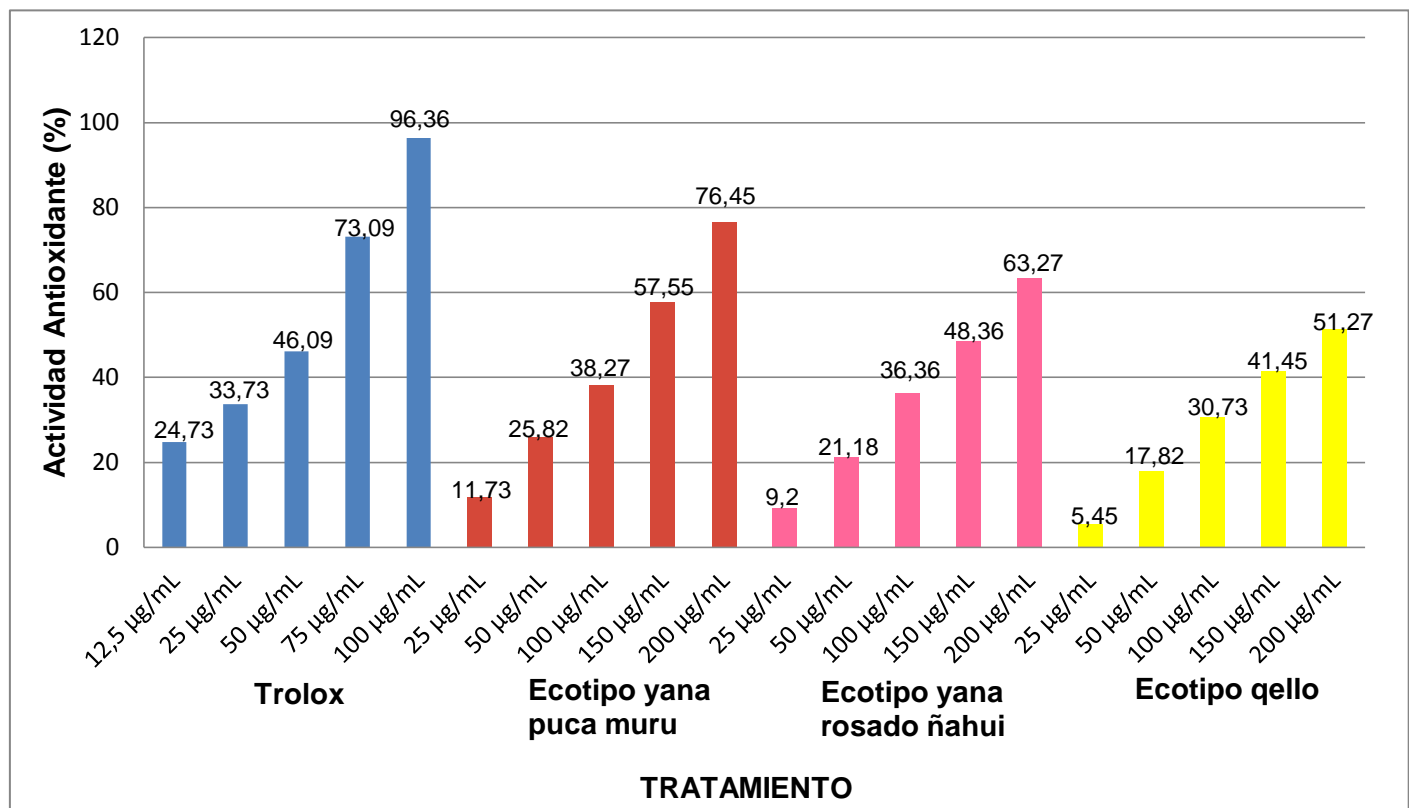


Figura 10: Porcentaje de la actividad antioxidante por el método de DPPH en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”. Ayacucho – 2018.

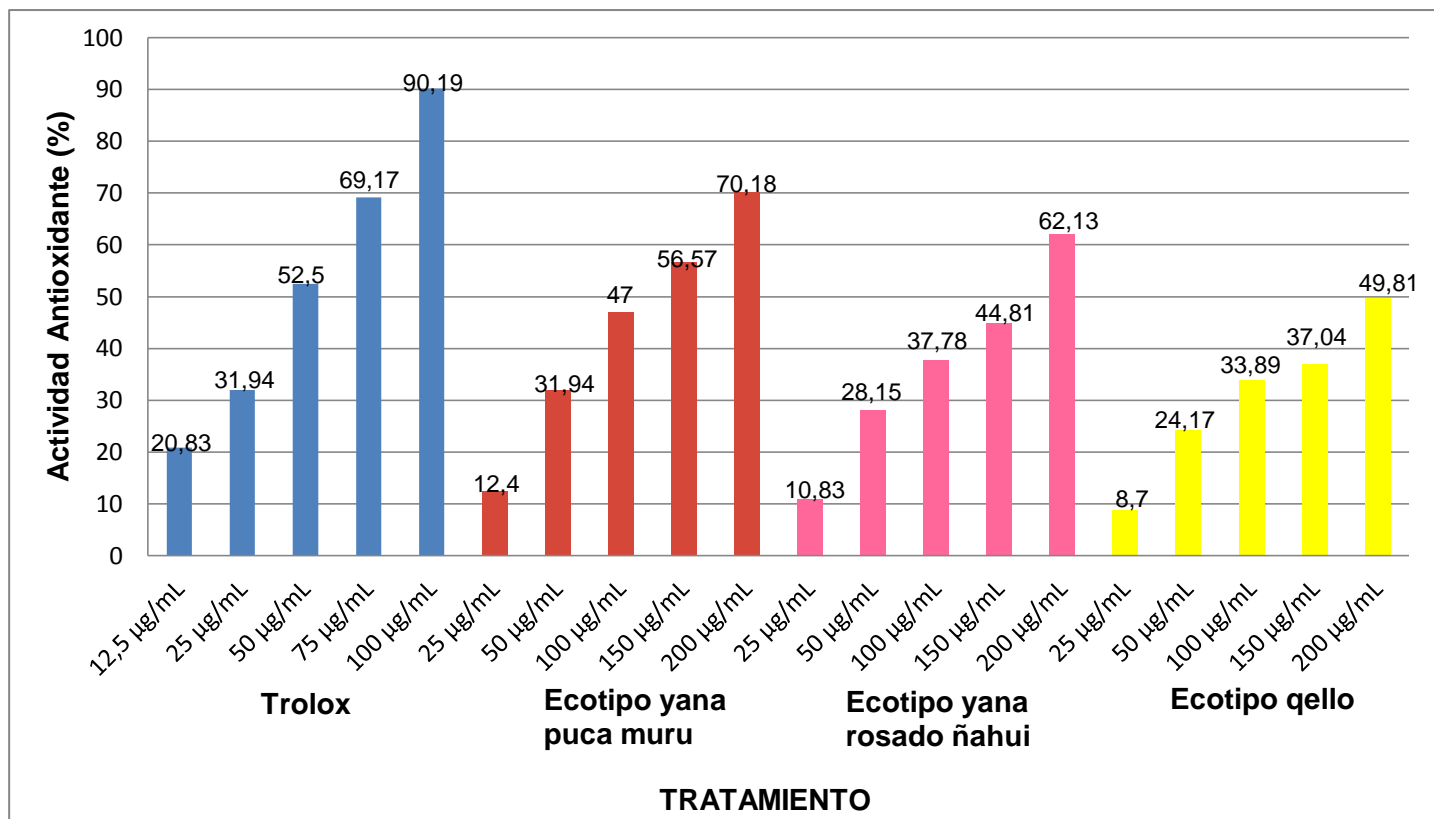


Figura 11: Porcentaje de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”. Ayacucho – 2018.

Tabla 4: Determinación del IC<sub>50</sub> en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”. Ayacucho – 2018.

<b>Estándar/ Ecotipos</b>	<b>IC<sub>50</sub> del DPPH</b>	<b>IC<sub>50</sub> del ABTS</b>
Trolox	46,63	48, 89
Yana puca muru	127,44	128,47
Yana rosado ñahui	154,66	156,20
Qello	184,64	199,52

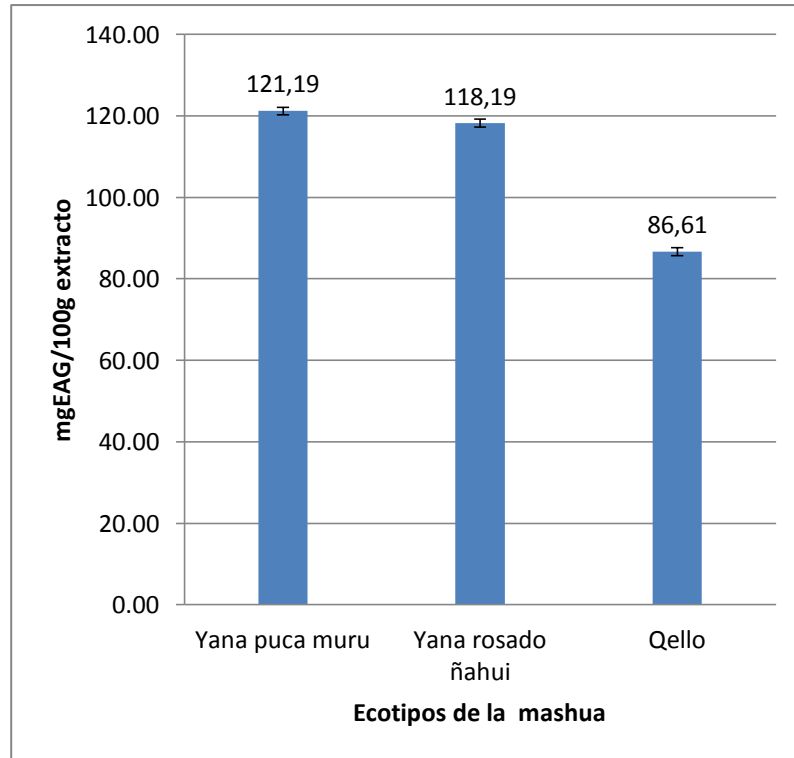


Figura 12: Polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho – 2018.



## V. DISCUSIÓN

La mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. & P.) es una planta nativa de los Andes centrales, presentan un gran valor nutricional, como carbohidratos, proteínas, vitaminas A y C.<sup>46</sup> Por otro lado, dentro de sus metabolitos secundarios se encuentran los polifenoles que poseen una gran gama terapéutica, entre las cuales se puede mencionar la relevancia de la actividad antioxidante *in vitro*.<sup>47</sup> El presente trabajo, brinda información sobre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro*.

Los compuestos fenólicos tales como los flavonoides y ácidos fenólicos son una de las sustancias más importantes fuentes de antioxidantes, actualmente este grupo de compuestos fitoquímicos presentan un gran interés por su contribución a la salud humana.<sup>48</sup>

Los compuestos de naturaleza fenólica juegan un papel importante en los procesos de oxidación lipídica y se les asocia con la actividad antioxidante, se les considera además con efectos inhibitorios sobre la mutagénesis y carcinogénesis en humanos cuando son incluidos en la dieta diaria a partir de productos naturales. Específicamente, ácidos fenólicos y flavonoides son típicamente reconocidos como poseedores de actividad antioxidante.<sup>49</sup>

Para la obtención del extracto hidroalcohólico se tomó 200 g de la muestra seca y pulverizada de cada uno de los tres ecotipos de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua", se maceró utilizando medio litro de etanol al 80 % en un recipiente de vidrio color ámbar durante una semana agitándole periódicamente a temperatura ambiente, luego las muestras maceradas se procedieron a filtrar con papel Whatman N°40 y finalmente se concentraron en el rotavapor a una temperatura de 50 °C hasta su sequedad en una estufa a una temperatura a 40 °C<sup>42</sup>

También, Chirinos *et al.*<sup>8</sup> cuantificaron compuestos fenólicos no antociánicos. Los compuestos encontrados en los diferentes genotipos fueron: ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, derivados de epigalocatequina y procianidina

B2, diferentes derivados de ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico y derivados de miricetina y/o rutina. Las proantocianidinas contribuyeron significativamente a la actividad antioxidante total, pero otros compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, monómeros de flavan-3-oles, flavonoles y antocianinas también contribuyeron en la capacidad antioxidante de este tubérculo.

Uno de los métodos para la determinación de polifenoles totales se basa en el método Folin-Ciocalteu, a partir de una curva estándar de ácido gálico, se cuantificó los polifenoles totales y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100 g de muestra).

Al realizar la prueba de comparación HSD Tukey se pudo observar que existe diferencia significativa en cuanto a los polifenoles totales de cada variedad ( $p < 0,05$ ), determinando que la variedad "qello" presenta 86,61 mg EAG/100 g, la variedad "yana rosado ñahui" 118,19 EAG/100 g y la variedad "yana puca muru" 121,19 EAG/100 g de muestra. Podemos observar que el contenido de polifenoles encontrados en este trabajo son menores a los reportados por Doylet *et al.*<sup>50</sup> donde se cuantificó los fenoles totales de la variedad Rosa y Amarilla encontrando 307,83 mg EAG/100 g y 268,93 mg EAG/100 g respectivamente. Tocando este punto afirma que el contenido de compuestos fenólicos se ve influenciado por diversos factores; entre ellos el genético, dado que las composiciones pueden variar significativamente entre variedades de una misma especie vegetal, además existen factores ambientales como la luz y temperatura que afectan el crecimiento y calidad del cultivo, finalmente, es importante mencionar el estado fisiológico; es decir, estado óptimo de madurez.

Muchos ensayos químicos *in vitro* han sido desarrollados para medir capacidades antioxidantes de los productos vegetales. A pesar de la reciente popularidad en la investigación de antioxidante, la falta de ensayos estandarizados para comparar los resultados de investigación de diferentes grupos de investigación ha sido un gran desafío. Los exámenes referidos a los antioxidantes, son necesarios para el desarrollo de métodos estandarizados que son ampliamente aplicables por los investigadores. Sin embargo, debido a la complejidad naturaleza de los sistemas biológicos, no existe un único método universal para medir capacidad antioxidante. Métodos antioxidantes como DPPH y ABTS son métodos ampliamente utilizados. El método DPPH se basa en La capacidad de donación de hidrógeno o captación de radicales del extracto reduce el 2,2-difenil-1-picrilhidraizil radical a 2,2 difenil-1-picrilhidrazina que da

como resultado una solución de color amarillo pálido, mientras que la método del 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6 sulfonato de amonio) (ABTS) se basa en La generación de radical ABTS y esto a su vez implica la producción directa de azul-verdedoso. El cromóforo ABTS a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio. La adición de antioxidantes al catión radical preformado la reduce a ABTS (decoloración de la solución), en una medida y en un calendario según la actividad del antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción.<sup>51</sup> Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método del DPPH es el más rápido, simple y de menor costo en comparación con otros modelo. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS+ se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.<sup>52</sup>

Al realizar la prueba HSD-Tukey para el ensayo de DPPH ( $p < 0,05$ ) se pudo obtener diferencias significativas entre grupos, observando que la variedad "yana puca muru" tuvo una mejor estabilización del radical DPPH ( $IC_{50} = 127,08 \mu\text{g/mL}$ ) y la variedad que tuvo una menor estabilización del radical libre fue la variedad "qello" ( $IC_{50} = 186,94 \mu\text{g/mL}$ ).

Por otro lado realizando la prueba de HSD-Tukey al ensayo de ABTS se pudo observar que las variedad "yana puca muru" obtuvo una mejor actividad antioxidante ( $IC_{50} = 128,47 \mu\text{g/mL}$ ) y la variedad con menor actividad fue qello ( $IC_{50} = 199,52 \mu\text{g/mL}$ ). El  $IC_{50}$  mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica y/o bioquímica.<sup>53</sup>

Cuya A.<sup>54</sup> indica que el proceso de secado afecta frecuentemente los compuestos fenólicos. En los resultados obtenido por este autor, utilizando la prueba estadística ANOVA, con un nivel de significancia  $p < 0,05$ , indica que existe alta significancia entre los niveles de temperatura sobre la perdida de actividad antioxidante. El análisis de comparaciones múltiples de medias, prueba de Tukey, con un nivel de significancia  $p < 0,05$ ; confirma dicha significancia, resultando menos la perdida de actividad antioxidante hidrofilia de la mashua seca. De la misma forma Pacco.<sup>11</sup> en su trabajo logra demostrar que la temperatura de cocción afecta en la medida que mientras mayor sea la temperatura es menor la capacidad antioxidante esto debido a que el que muchos fitoquímicos son sensibles al calor.

Dado lo mencionado, y comparando con los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se tomó en cuenta el factor secado de la muestra y la exposición a la

temperatura, por lo cual un incremento en estos factores tienden a disminuir la capacidad de los polifenoles de estabilizar el radical de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6 sulfonato de amonio) (ABTS).

## VI. CONCLUSIONES

1. Los extractos hidroalcohólicos de los tres ecotipos del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”, presentan actividad antioxidante y polifenoles totales.
2. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de los tres ecotipos fueron fenoles, flavonoides, azúcares reductores y cumarinas.
3. La actividad del radical libre DPPH para los ecotipos: “yana puca muru”, “yana rosado ñahui” y “qello” fueron con  $IC_{50}=127,44$ ;  $154,66$  y  $184,64$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y con el ensayo de ABTS fueron con  $IC_{50}=128,47$ ;  $156,20$  y  $199,52$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.
4. El contenido de polifenoles para los ecotipos “yana puca muru”, “yana rosado ñahui” y “qello” fueron  $121,19$ ;  $118,19$  y  $86,61$  mg EAG/100 g de extracto respectivamente.



## VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con los estudios de la actividad antioxidante *in vivo* puesto que demostró tener actividad antioxidante. Realizar ensayos *in vivo* con animales de experimentación para evaluar los efectos fisiológicos de compuestos bioactivos de la mashua como son los polifenoles para obtener valores comparativos y evaluar la eficiencia de los métodos *in vivo*.
2. Seguir realizando estudios para los demás ecotipos y sus propiedades que se le otorga a la mashua.
3. Profundizar por HPLC de los compuestos fenólico, así como también identificar las antocianinas presentes en el extracto de mashua del ecotipo “yana puca muru”. Para determinar específicamente que compuestos fenólicos y antocianinas son los responsables de las propiedades funcionales.
4. Promover e incentivar el consumo de la mashua, ya que es una fuente en antioxidantes y polifenoles, necesarias para prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, próstata, etc.
5. Dar a conocer a la población y que tomen conciencia sobre la gran importancia de los buenos hábitos alimenticios y la relación que tienen en una vida saludable, en este caso la mashua por ser una planta que crece en nuestra región y tiene un precio económico al alcance de todos.



### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Youngson R. ¿Qué son los radicales libres?, en: Antioxidantes y radicales libres. Madrid: ACRIBIA. 2004:15-29.
2. Pérez Gastell P.L., Pérez de Alejo J.L. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev. Cubana Med Milit; 2000; 29: 192-8.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. Oxford: Clarendon, England, United Kingdom; 1989; 1: 142.
4. Wang, H., Cao, G., & Prior, Ronald. Total Antioxidant Capacity of Fruits. Journal Agricultural Food Chemistry, Boston, Massachusetts. 1996; 44(3), 701-705.
5. Quispe, C., Mansilla, R., Chacón, A., Blas, R. Análisis de la variabilidad morfológica del "Añu " *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón procedente de nueve distritos de la región Cusco, Perú; 2015; 14(2).
6. Beltran AF, Mera JG. Elaboración del tubérculo mashua (*tropaeolum tuberosum*) troceada en miel y determinación de la capacidad antioxidante [Tesis pre grado]. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química; Guayaquil, Ecuador; 2014.
7. Betalleluz, I.; Chirinos, R.; Rogez, H.; Pedreschi, R.; Campos, D. Phenolic compounds from Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum*) tubers display protection against soybean oil oxidation. Food Science and Technology International. Vol. 18(3): 271-280, England, United Kingdom; 2012.
8. Chirinos, R.; Campos, D. Costa, N.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. Food Chemistry. Vol. 106; Cambridge, England, United Kingdom. 2008; 1285-1298.
9. Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W., Cisneros-Cevallos, L. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). Journal of the Science of Food and Agriculture. Cambridge, England, United Kingdom ; 2006. 86, 14811488.
10. Inostroza LA, Castro AJ, Hernández EM, Carhuapoma M, Yuli RA. Collado A, Córdova JS. Actividad antioxidante de *tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) y su aplicación como colorante para yogur. Ciencia e Investigación de la UNMSM, Lima, Perú; 2015; 18(2): 83-89.
11. Pacco E. "Evaluación del efecto del soleado y la cocción en la capacidad antioxidante del puré deshidratado de mashua (*tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)." [Tesis pre grado]. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Puno, Perú; 2015.
12. Córdova, C. Evaluación del efecto del secado a dos temperaturas en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de la mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012; 125 p.
13. Morales N. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro ecotipos del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. "mashua". [tesis para obtener el título profesional de Químico Farmacéutico]. Ayacucho, Perú; 2013.

14. Arbizu, C. and M. Tapia. Tuberculos Andinos. In: Cultivos Marginados, otra perspectiva de 1492 (J.E.Hernández and J. León, eds). Colección FAO: Producción y protección vegetal No.26, FAO, Rome, Italy; 1992: 147-161.
15. Cadima, X. Tubérculos. In R. Moraes, B. Øllgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius and H. Balslev H (ed.) Botánica Económica de los Andes Centrales. (In Spanish, with English abstract.) Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia; 2006: 347–369.
16. Travis A. Clark. Mashua. Southern Illinois University Carbondale/Ethnobotanical Leaflets; 1999:1-6.
17. Barreda, V., Espinoza, C., Tapia C., Monteros, A. y Valverde., F. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tuberculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo 1993-2003. Raices y tuberculos andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza; 2004.
18. Tapia C. & Estrella J. Genetic erosion quantification in ullucus (*Ullucus tuberosus* Caldas), oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) and mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) in agrosystems of the provinces of Cañar, Chimborazo and Tungurahua, Ecuador. In: Proceedings of the international symposium "Managing biodiversity in agricultural ecosystems", 8-10 November 2001, Montreal, Canada; 2001.
19. Hernandez, B. Leon, J. Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma. 1992; 150 -151.
20. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995; 7: 1085 – 1097.
21. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*. 2006; 78(25): 2872 – 2888.
22. Siquet, C., Paiva, F., Reis, S., Borges, F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-A structure-activity relationship study. *Free Radicla Research*. Portugal. 2006; 40 (4): 433-442.
23. Aherne SA y O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002; 18: 75-8.
24. Havsteen B: Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*. 1983; 32: 1141-1148.
25. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y y cols. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 1655-1660.
26. Saskia ABE, van Accker y Bast AALT: Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York. 1998; 9: 221-251.
27. Vrijssen R, Everaert L y Boeté A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *J Gen Virol*. 1988; 69: 1749-1751.
28. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon. 1989; 1: 142.
29. Mayor, R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Servicio de Pediatría del Instituto de Medicina Tropical, Asunción. Paraguay. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2010; 5(2): 23-29.
30. Cross C, Halliwell B, Borish E, Pryor W, Ames B, Saul R, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*; Philadelphia; 2009, 107: 526-54.

31. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Rev. Anales de la Facultad de Medicina. Costa Rica: Vol.57 N°4: 278-281; 1996.
32. Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. España: Acibia Zaragoza. 2001.
33. Frankel, E., Waterhouse, A. y Teissedre, P. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. J. Agric. Food Chem. 1996; 43: 890-894.
34. Perez Gastel P.L., Pérez de Alejo J.L. Métodos para medir el daño oxidativo, en: Rev. Cubana Med Milit. 2000; 29: 192-8.
35. Rodríguez, J., Menéndez, J., Trujillo, Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Instituto superior de medicina militar Cuba; 2001
36. Justo R. Venereo Gutiérrez. "Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes" Rev Cubana Med Milit, Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto. 2002;31(2):126-33
37. Ojha H., Mishra K., Chaudhury N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry. 2012; 130: 1036–1043.
38. Re R., Pellegrini Ni., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999; 26: 1231–1237.
39. Pellegrini N, Serafino M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nutr. 2003;133:2812-9.
40. Pilar A. Determinación de la Actividad Antioxidante de las Bayas de Goji, BIO-ENER S.L., [Tesis para obtención de Ingeniería agroalimentaria y del medio rural]. Consorci Escola Industrial de Barcelona; 2009.
41. Villar de Fresno, M. Farmacognosia General. España: Síntesis; 1999.
42. Mayhua Garcia H. Actividad diurética del extracto hidroalcoholico del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* "mashua" en ratas [tesis para obtener el título profesional de Químico Farmacéutico], Farmacia y bioquímica, UNSCH, Ayacucho, Perú; 2007.
43. Miranda, M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Cuba: Universidad de la Habana; 1996.
44. Thaipong, K.; Boonprakop, U., Crosby, K; Cisneros Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH , FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 2006, 19,669-675.
45. Bustamante J. Determinación de compuestos antioxidantes en subproducto de cacao "testa" [tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Químico]. Universidad Técnica Particular de Loja. La Universidad Católica de Loja. Ecuador; 2014.
46. Pillajo J. Estudio del proceso para la obtención de Chips salados de mashua. [Tesis], Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Quito, Ecuador; 2014.
47. Junes R. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro y efecto regenerador in vivo de una crema cosmetica con extracto liofilizado de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz&Pavón). [Tesis de Maestría], Facultad de Farmacia y Biquímica, Lima, Perú; 2017.
48. Mamani S. Evaluación del efecto de tres procesos agroindustriales en la estabilidad de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes en dos variedades de quinua (*chenopodium quinoa* Willd). [Tesis], Facultad de Ciencias de la salud, Puno, Perú; 2015.

49. Guimet R. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de polifenoles totales *in vitro*, de las hojas de ocho morfotipos de *Bixa orellana* L. [Tesis], Facultad de Farmacia y Bioquímica, Iquitos, Perú; 2018.
50. Doyle R. y Rodriguez L. Estudio comparativo de la composición química y carácter reductor de dos variedades de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz y Pavón, Kuntza) "mashua". [Tesis], Facultad de Ciencias Químicas, Guayaquil, Ecuador; 2018.
51. Parimelazhagan T. Pharmacological Assays of Plant. Based Natural Products. Department of Botany Bharathiar University Coimbatore, Vol 71, Tamil Nadu, India; 2016.
52. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol. 1995; 20: 25-30.
53. Joshi S, Verma A, Mathela C. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. Food and Chemical Toxicology. 2010; 48: 37-40. Citado en: Pubmed; PMID: 19766161.
54. Cuya A. Efecto de secado en bandeja y atomizado sobre la actividad antioxidante de la mashua (*Tropeolum tuberosum* R&P), [Tesis de Maestría], Escuela de pos grado, Especialidad de Tecnología de Alimentos, Lima, Perú; 2009.

## **ANEXOS**



Anexo N° 1. Certificado de la identificación de la muestra de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

### C E R T I F I C A

Que, la Bachiller. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Zussety Katherine RIOJAS LOAYZA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	GERANIALES
FAMILIA	:	TROPAEOLACEAE
GENERO	:	<i>Tropaeolum</i>
ESPECIE	:	<i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P.
N.V.	:	"mashua "

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 11 de Setiembre del 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Biga Louru Aucastine Medina  
JEFE

Anexo N° 2. Certificado de la identificación de los ecotipos de las muestras de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
Departamento Académico de Agronomía y Zootecnia

**EL QUIEN SUSCRIBE, PROFESOR DE LA CATEDRA DE PRODUCCIÓN Y MANEJO DE SEMILLAS DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA:**

## CERTIFICA

Que, la señorita Zussety Katherine **RIOJAS LOAYZA**, estudiante de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica ha solicitado la identificación de ecotipos de muestras de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. (Mashua), las mismas que han sido identificadas como sigue:

Muestra 01: Ecotipo yana rosado ñahui

Muestra 02: Ecotipo yana puca muru

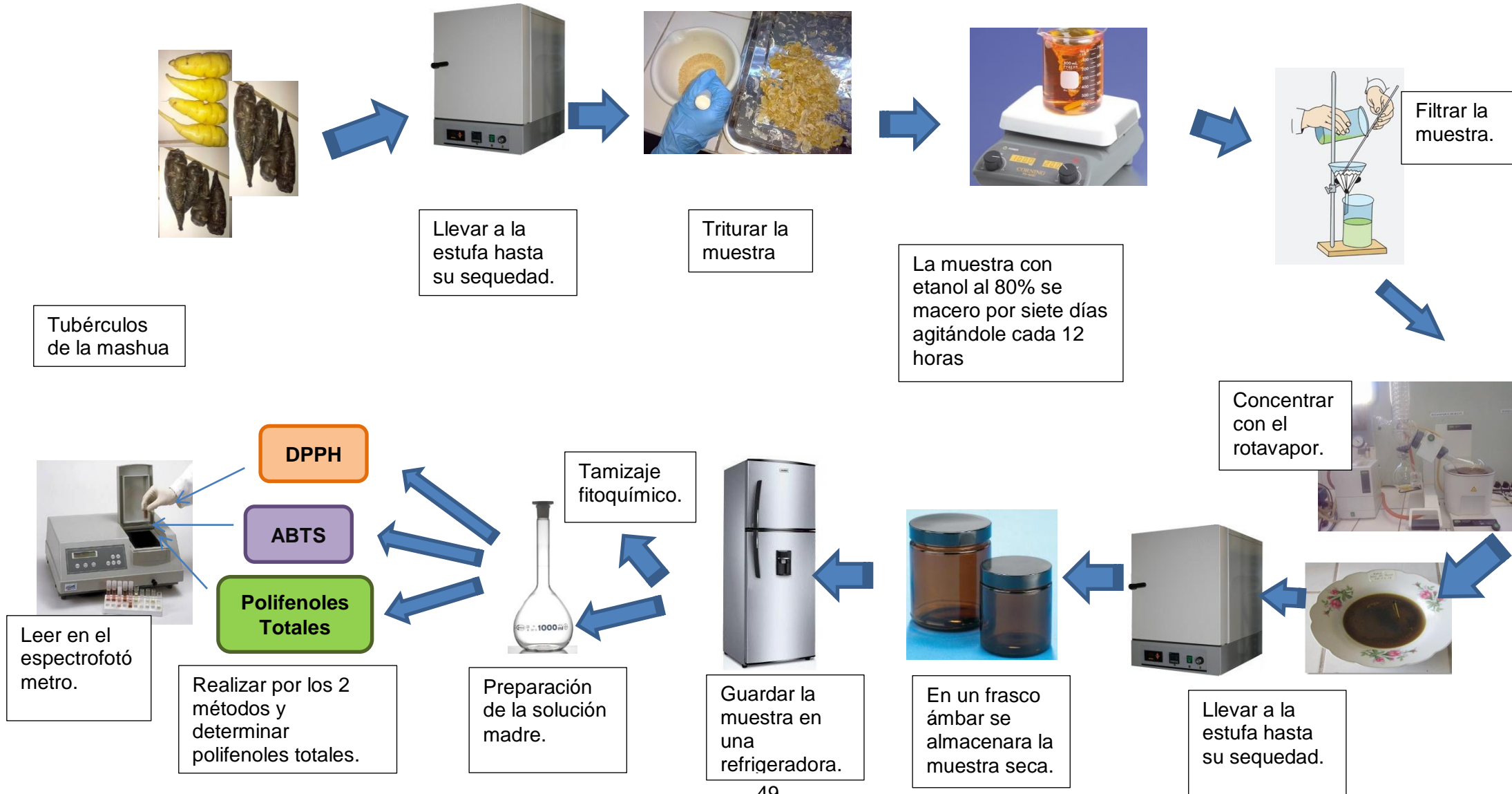
Muestra 03: Ecotipo qello

Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada, para los fines que lo estime conveniente.

Ayacucho, 15 de setiembre del 2017

  
Dr. ROLANDO BAUTISTA GOMEZ  
DOCENTE

ANEXO N°3. Diagrama de la preparación de la muestra de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



Anexo N° 4. Caracterización fitoquímica.

<b>Ensayo</b>	<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Resultados</b>
Cloruro férrico	Fenoles	Formación de coloración oscura
Shinoda	Flavonoides	Formación de coloración naranja, carmelita y rojo
Fehling	Azucares reductores	Formación de precipitado rojo ladrillo
Baljet	Cumarinas y lactonas	Formación de coloración roja

Anexo N° 5. Preparación de la muestra de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



Ecotipo "yana puca muru"



Ecotipo "yana rosado ñahui"



Ecotipo "qello"



Fueron trozados en forma transversal hasta obtener láminas delgadas



Se colocó en una estufa a 40°C



Se trituro las muestras secas



Se tomó 200 g de cada uno de los tres ecotipos y se maceró en medio litro de solución hidroalcohólica al 80%



Se filtró con papel Whatman N° 40



La solución hidroalcohólica se concentró en el rotavapor a una temperatura de 50 °C.



Ecotipo "yana puca muru" en un recipiente



Ecotipo "yana rosado ñahui" en un recipiente

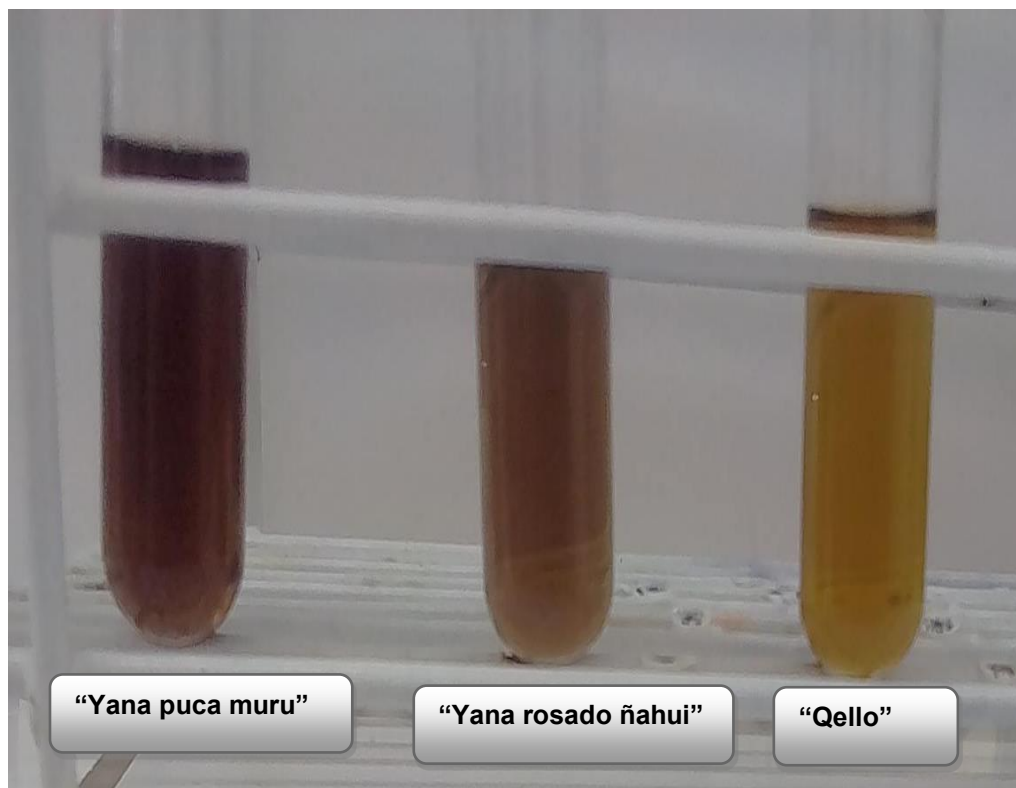


Ecotipo "qello" en un recipiente

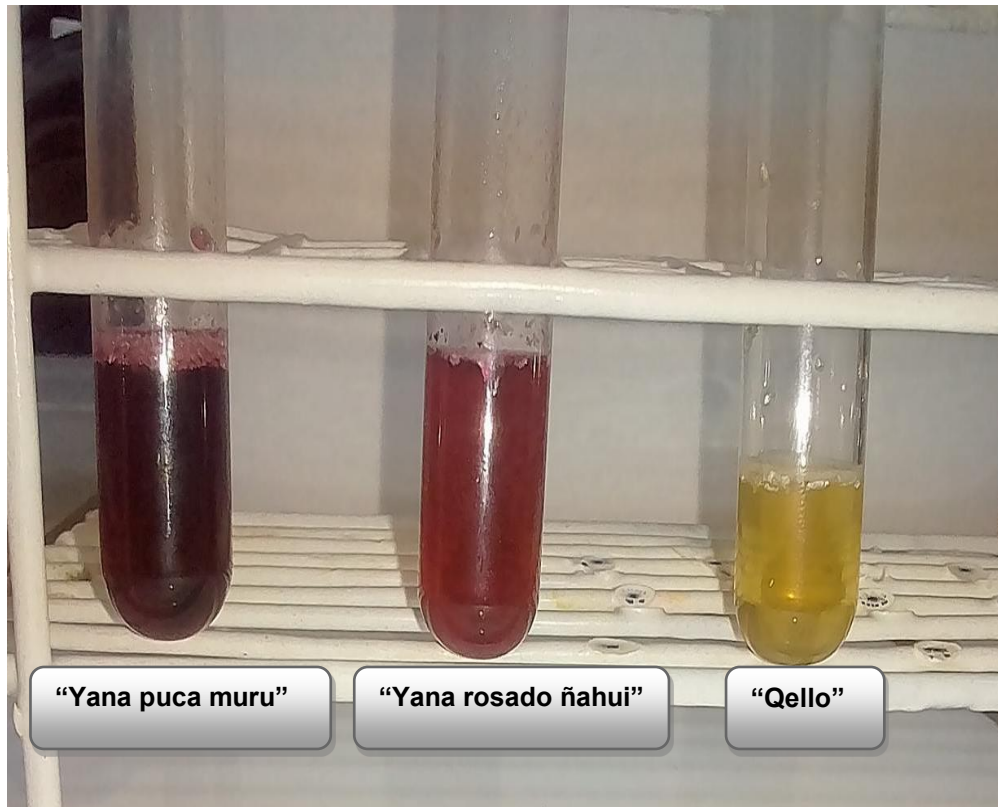


Se dejó hasta su sequedad en una estufa a una temperatura a 40°C

Anexo N° 6. Ensayo con cloruro férrico en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



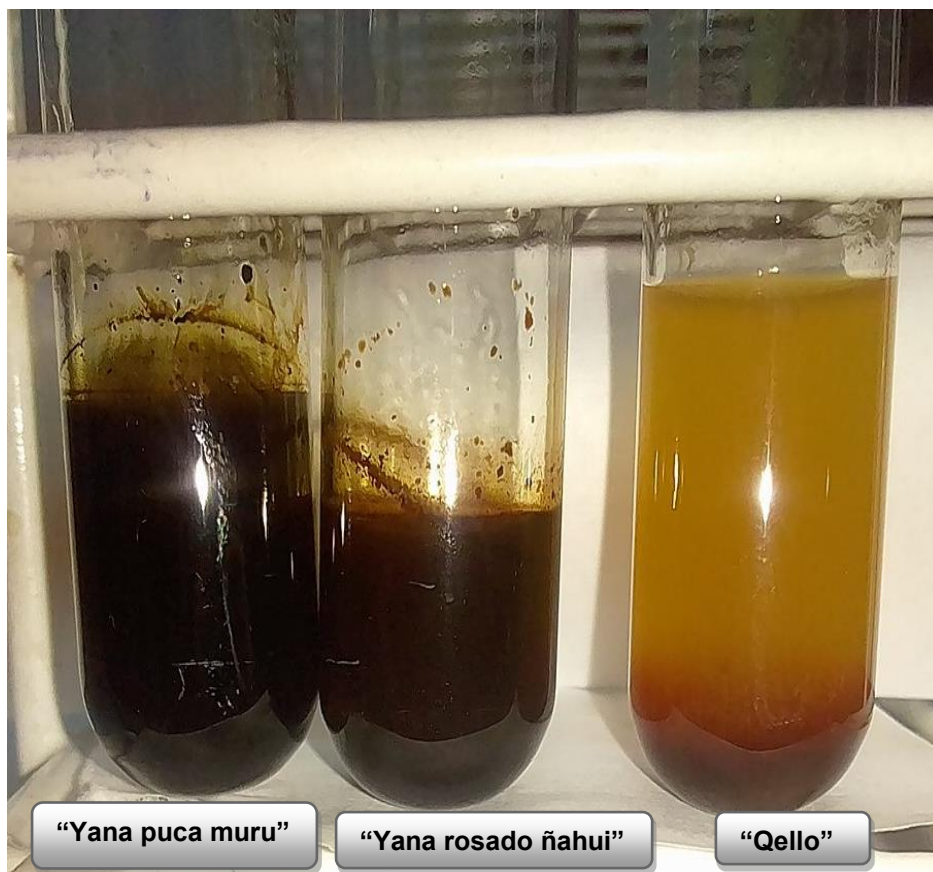
Anexo N° 7. Ensayo con Shinoda en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



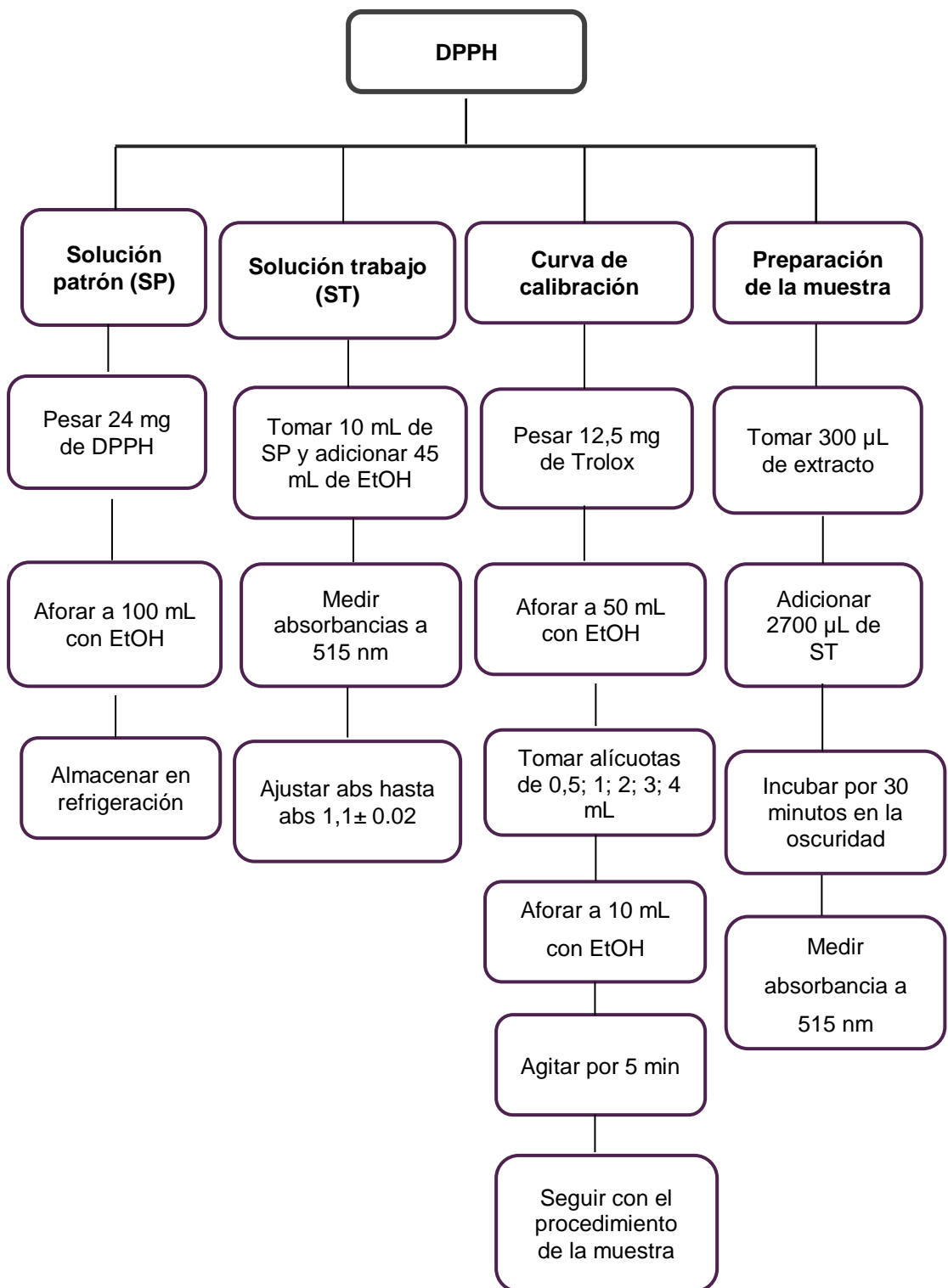
Anexo N° 8. Ensayo con Baljet en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



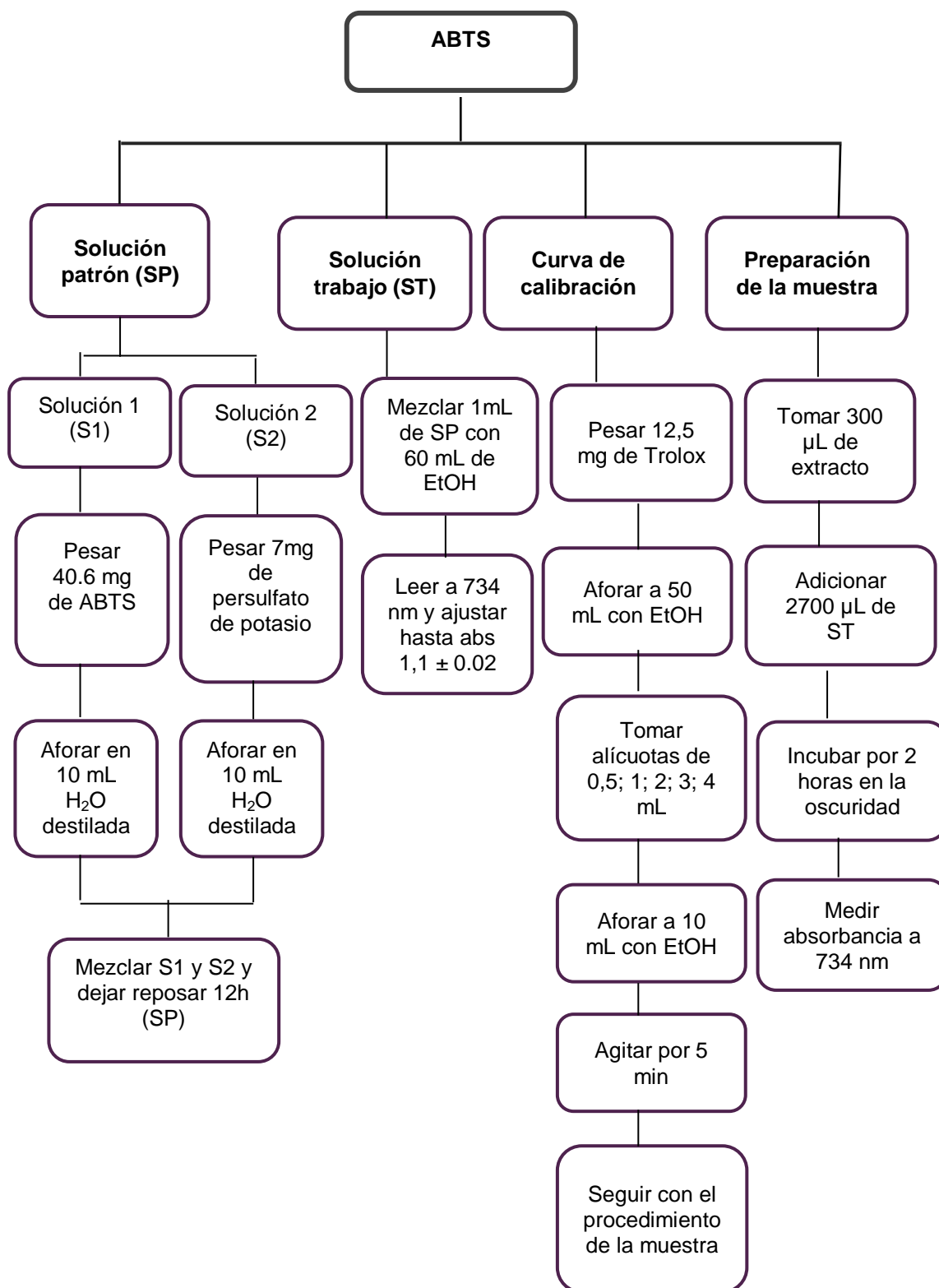
Anexo N° 9. Ensayo con Fehling en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



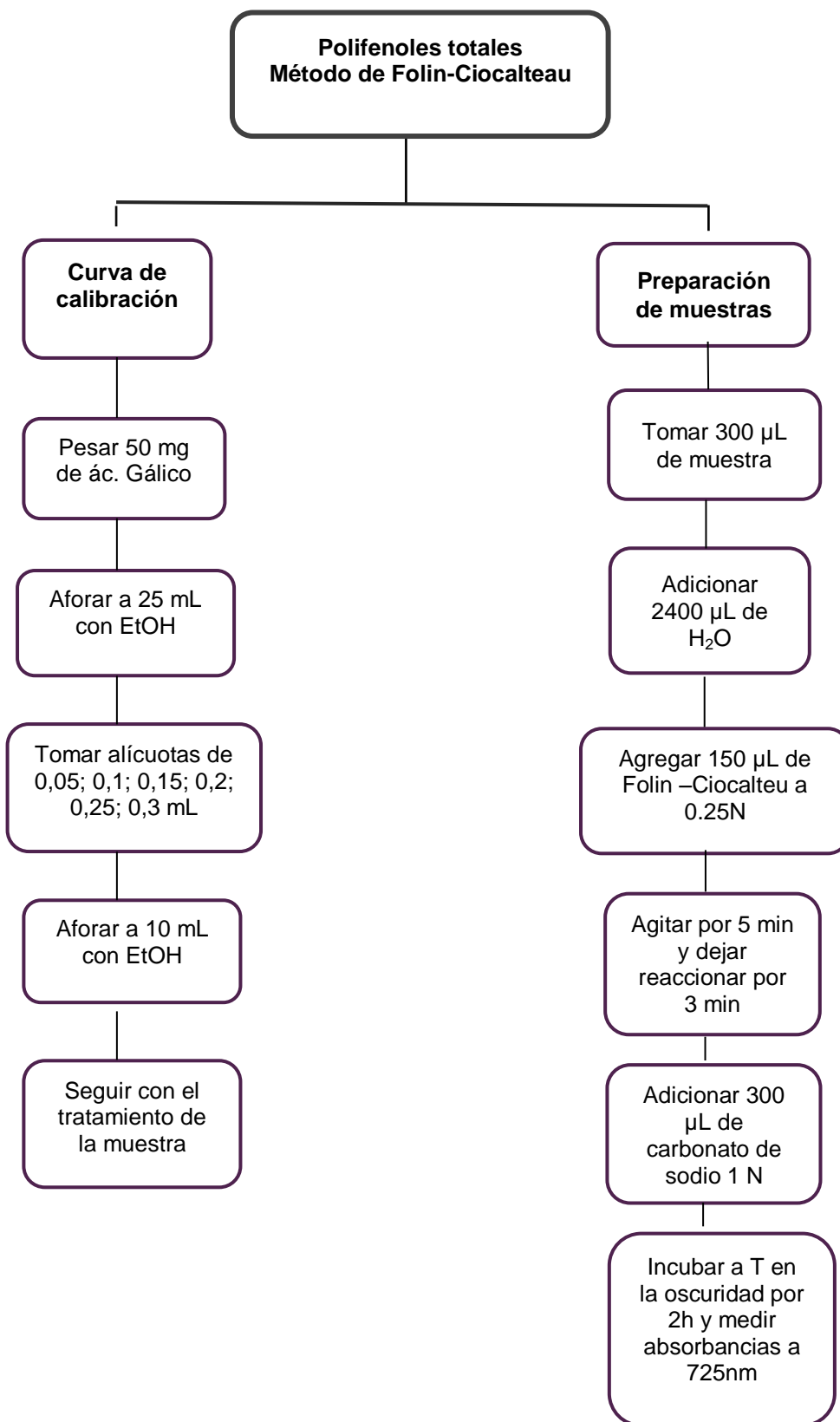
Anexo N° 10. Diagrama del método DPPH.



Anexo N° 11. Diagrama del método ABTS.



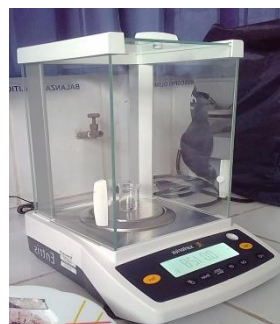
Anexo N° 12. Diagrama de la determinación del contenido de polifenoles totales.



Anexo N° 13. Procedimiento de la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



Se pesó 24 mg del reactivo DPPH para su preparación



Se pesó 12,5 mg del reactivo Trolox



Se realizó diluciones de 0,5; 1; 2; 3; 4 mL y se aforó a 10 mL de etanol



Se agitó por cinco minutos



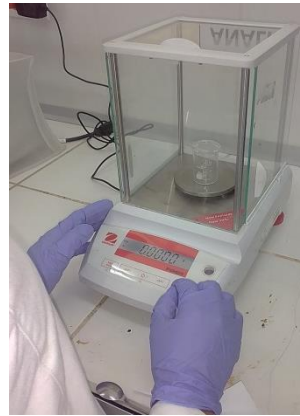
Se preparó las solución patrón y de trabajo



Se hicieron lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a 515 nm



Diluciones del Trolox



Se pesó 25 mg de cada muestra de los ecotipos



Se prepararon soluciones de cada ecotipo



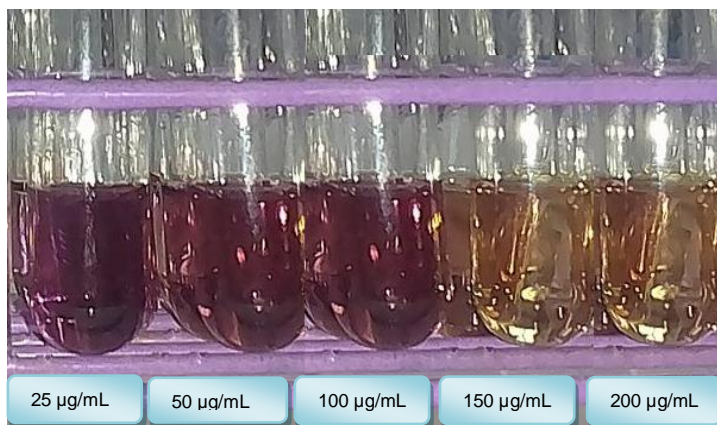
Se realizó diluciones de 0,5; 1; 2; 3; 4 mL y se aforó a 10 mL de etanol



Se hicieron lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a 515 nm

Anexo N° 14. Evaluación de la actividad antioxidante a distintas concentraciones por el método de DPPH en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.

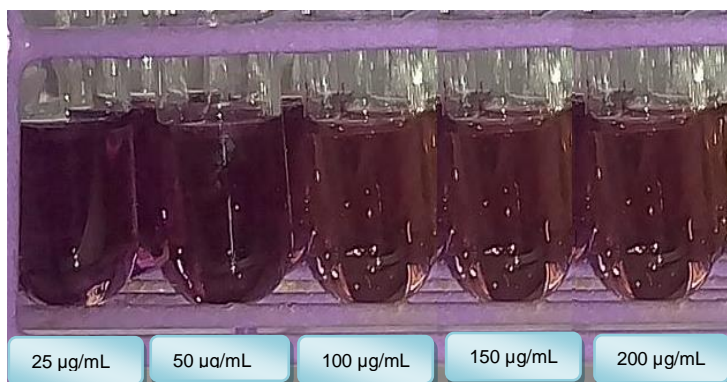
Ecotipo "Yana puca muru"



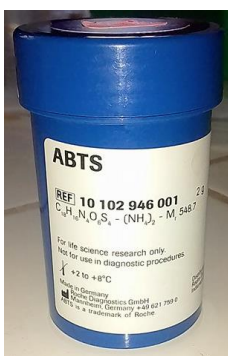
Ecotipo "Yana rosado ñahui"



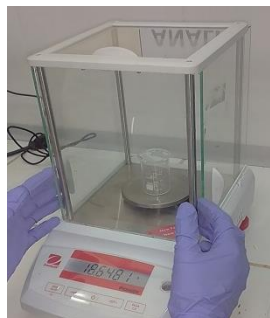
Ecotipo "Qello"



Anexo N° 15. Procedimiento de la determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



Reactivo de ABTS



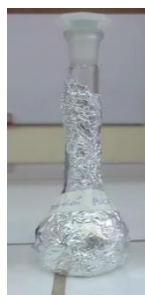
Se pesó 40,6 mg del reactivo ABTS para su preparación



Se aforó en 10 mL de agua destilada



Se pesó 7 mg de Persulfato de potasio y se aforó en 10 mL de agua destilada



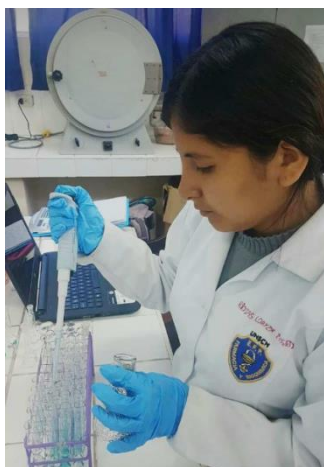
Se mezcló las dos soluciones y se dejó reposar por 12 horas.



Se pesó 12,5 mg del reactivo Trolox



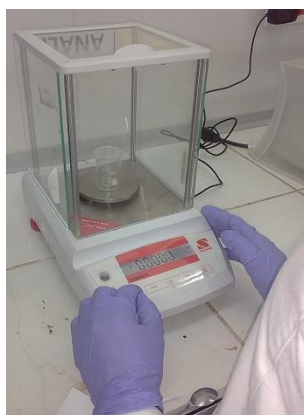
Se realizó diluciones de 0, 0.5, 1, 2, 3,4 ml y se aforó a 10 mL de etanol



Se preparó las solución patrón y de trabajo



Se hicieron lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a 734 nm



Se pesó 25 mg de cada muestra de los ecotipos



Se prepararon soluciones de cada ecotipo



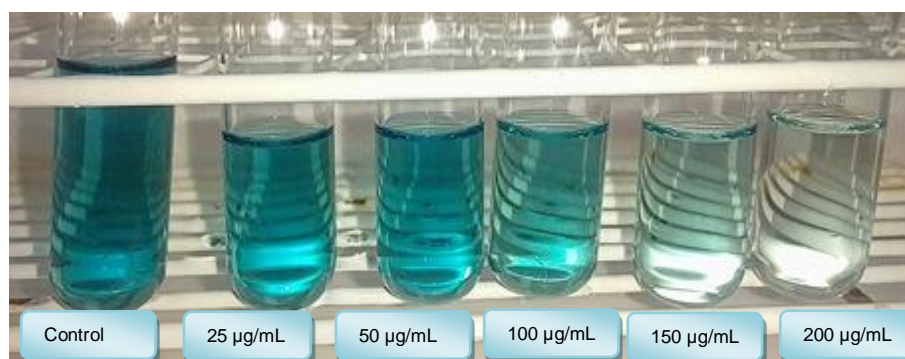
Se realizó diluciones de 0,5; 1; 2; 3; 4 mL y se aforó a 10 mL de etanol



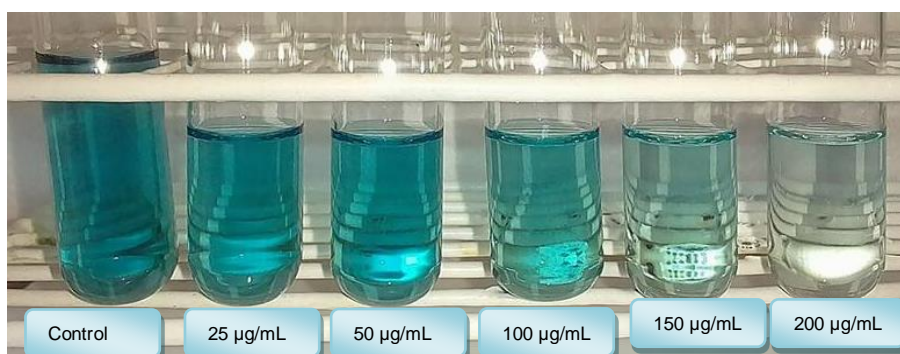
Se hicieron lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a 734 nm

Anexo N° 16. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.

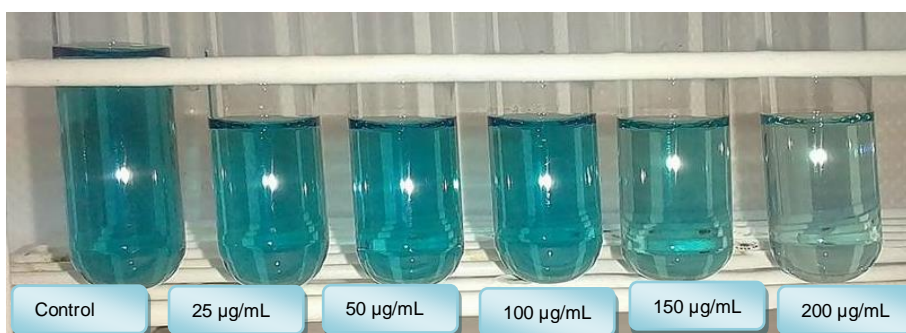
Ecotipo "Yana puca muru"



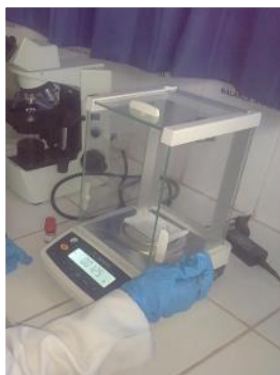
Ecotipo "Yana rosado ñahui"



Ecotipo "Qello"



Anexo N° 17. Procedimiento de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.



Se pesó 50 mg de ácido gálico



Se aforó a 25 mL con EtOH



Se realizó diluciones de 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mL



Se aforó a 25 mL con EtOH



Se tomó 300  $\mu$ L de cada muestra



Se adicionó 2400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O



Se agregó 150  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu a 0.25N



Se agitó por 5 minutos y se dejó reaccionar por 3 minutos



Se agregó 300  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio

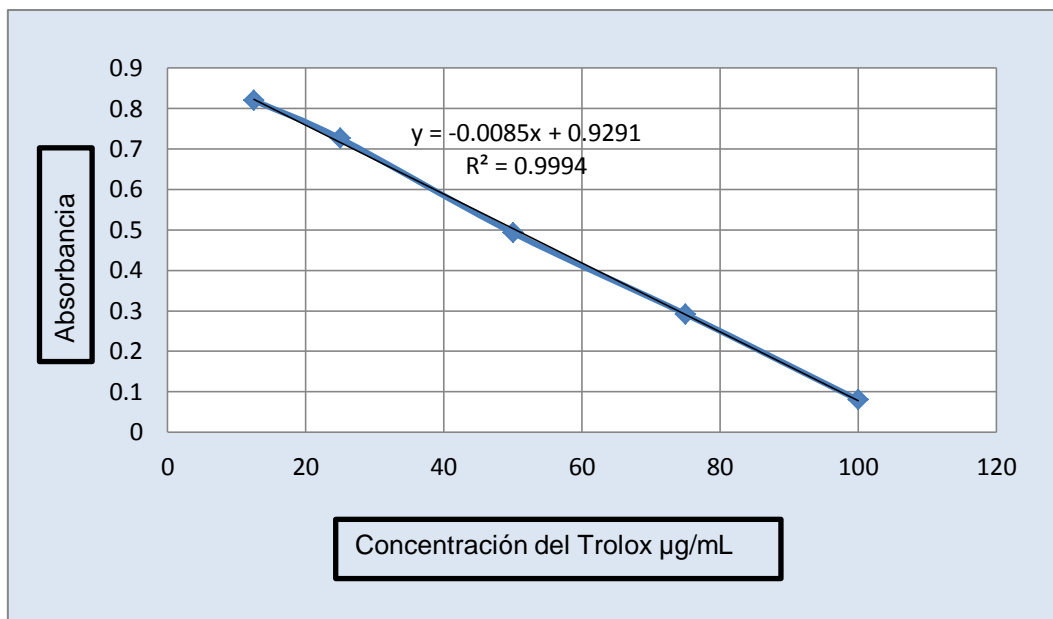


Se hicieron lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a 725 nm

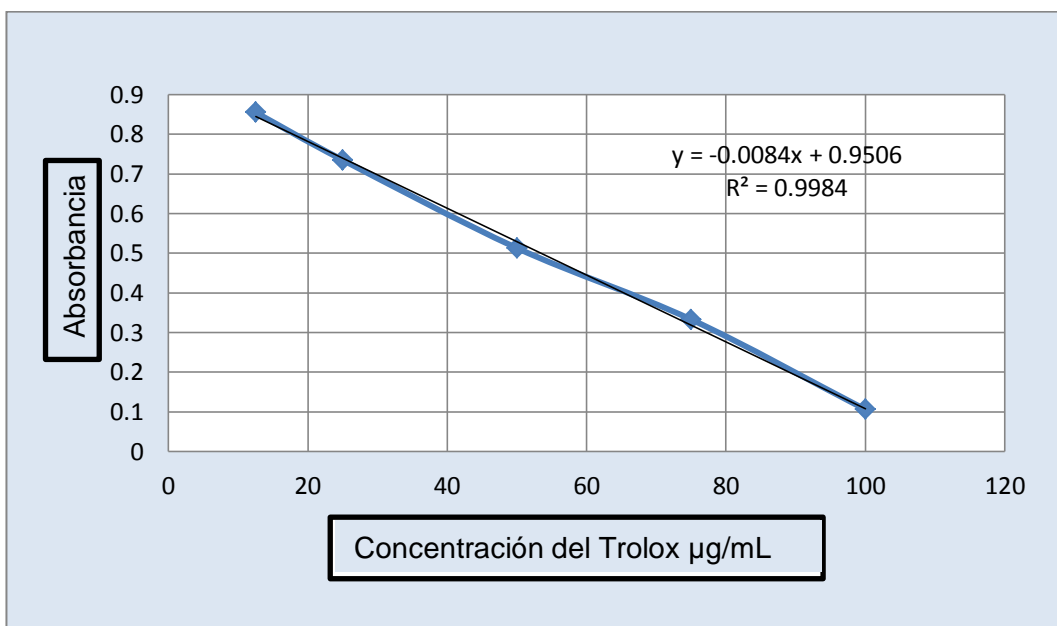


Diluciones para la curva de calibración de ácido gálico

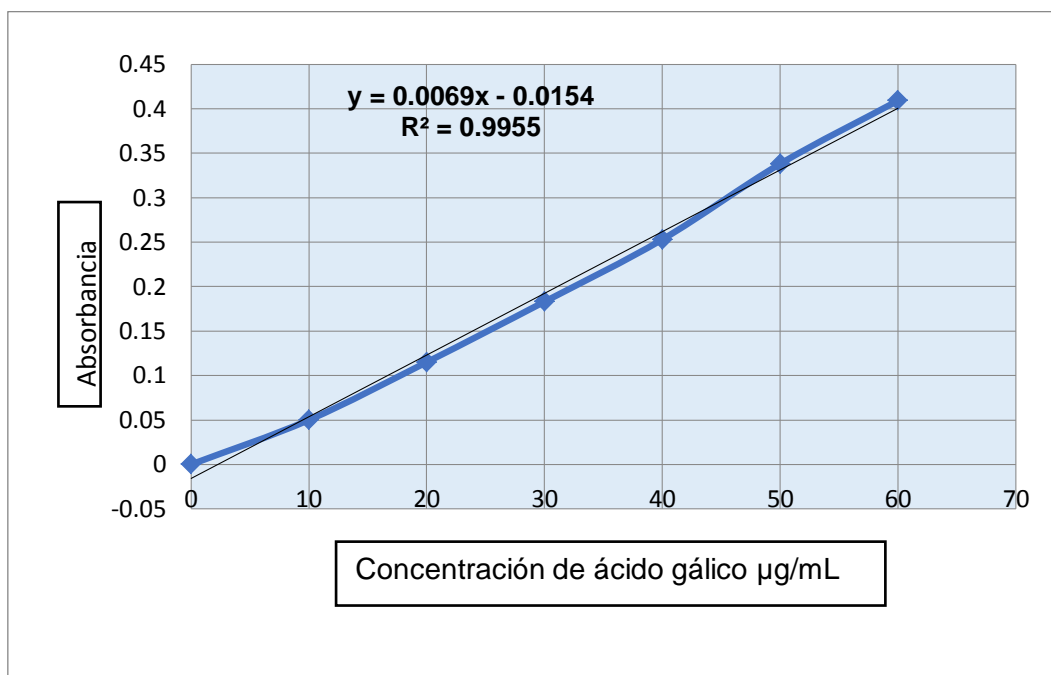
Anexo N° 18. Curva de calibración del DPPH.



Anexo N° 19. Curva de calibración del ABTS.



Anexo N° 20. Curva de calibración de polifenoles totales.



Anexo N° 21. Prueba estadística de ANOVA y Tukey del DPHH

**ANOVA**

**IC<sub>50</sub>**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	94764,718	3	31588,239	81447,099	,000
Dentro de grupos	12,411	32	,388		
Total	94777,129	35			

**IC<sub>50</sub>**

**HSD Tukey<sup>a</sup>**

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Trolox	9	46,6933			
Puca	9		127,4433		
Rosa	9			154,6600	
Qello	9				184,6400
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

**IC<sub>50</sub>**: Concentración inhibitoria del 50%

Anexo N° 22. Prueba estadística de ANOVA y Tukey del ABTS.

**ANOVA**

**IC<sub>50</sub>**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	108520,972	3	36173,657	88045,005	,000
Dentro de grupos	13,147	32	,411		
Total	108534,119	35			

**IC<sub>50</sub>**

**HSD Tukey<sup>a</sup>**

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Trolox	9	48,8900			
Puca	9		128,4744		
Rosa	9			156,2044	
Qello	9				199,5189
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Anexo N° 23. Prueba estadística de ANOVA y Tukey de polifenoles totales.

### ANOVA

#### POLIFENOLES

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2201,441	2	1100,721	1060,708	,000
Dentro de grupos	6,226	6	1,038		
Total	2207,668	8			

### POLIFENOLES

#### HSD Tukey<sup>a</sup>

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Quello	3	86,6133		
Rosa	3		118,1867	
Puca	3			121,1900
Sig.		1,000	1,000	1,000

Anexo N° 24. Porcentaje de la actividad antioxidante por el método de DPPH en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. “mashua”. Ayacucho – 2018.

% A.A en el DPPH		
Estándar/ Ecotipos	Concentraciones	Porcentajes
<b>Trolox</b>	12,5 µg/mL	24.73
	25 µg/mL	33.73
	50 µg/mL	46.09
	75 µg/mL	73.09
	100 µg/mL	96.36
<b>Yana puca muru</b>	25 µg/mL	11,73
	50 µg/mL	25,82
	100 µg/mL	38,27
	150 µg/mL	57,55
	200 µg/mL	76,45
<b>Yana rosado ñahui</b>	25 µg/mL	9,2
	50 µg/mL	21,18
	100 µg/mL	36,36
	150 µg/mL	48,36
	200 µg/mL	63,27
<b>Qello</b>	25 µg/mL	5,45
	50 µg/mL	17,82
	100 µg/mL	30,73
	150 µg/mL	41,45
	200 µg/mL	51,27

Anexo N° 25. Porcentaje de la actividad antioxidante por el método de ABTS en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R. & P. "mashua". Ayacucho – 2018

% A.A en el ABTS		
Estándar/ Ecotipos	Concentraciones	Porcentaje
<b>Trolox</b>	12,5 µg/mL	20,83
	25 µg/mL	31,94
	50 µg/mL	52,5
	75 µg/mL	69,17
	100 µg/mL	90,19
<b>Yana puca muru</b>	25 µg/mL	11,48
	50 µg/mL	27,78
	100 µg/mL	47,04
	150 µg/mL	56,57
	200 µg/mL	69,35
<b>Yana rosado ñahui</b>	25 µg/mL	10,83
	50 µg/mL	28,15
	100 µg/mL	37,78
	150 µg/mL	44,81
	200 µg/mL	62,13
<b>Qello</b>	25 µg/mL	8,70
	50 µg/mL	24,17
	100 µg/mL	33,89
	150 µg/mL	37,04
	200 µg/mL	49,81

Anexo N°26. Matriz de consistencia.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Actividad antioxidante y polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua". Ayacucho - 2018.	¿Tendrán diferente actividad antioxidante y diferente contenido de polifenoles totales los extractos hidroalcohólicos de los tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua"?	<p><b>Objetivo General.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua".</li> </ul> <p><b>Objetivos Específicos.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Identificar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua".</li> <li>Comparar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua" con el estándar trolox.</li> <li>Comparar el contenido de polifenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua".</li> </ul>	<p><b>Descripción Botánica</b></p> <p>La mashua es una planta herbácea perenne trepadora, glabra de 20-80 cm de alto, de crecimiento inicialmente erecto, que luego varía a semipostrado y es ocasionalmente trepador, mediante pecioloos táctiles con un follaje que puede variar de verde amarillento a verde oscuro.</p> <p><b>Compuesto Fenólico</b></p> <p>Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros</p> <p><b>Radicales libres (RL)</b></p> <p>Se consideran RL aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad.</p> <p><b>Antioxidantes</b></p> <p>Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Estos pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios.</p>	El extracto hidroalcohólico de los tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P. "mashua" poseen diferente actividad antioxidante y diferente contenido de polifenoles totales.	<p><b>Variable independiente.</b></p> <p>Extracto hidroalcohólico de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua"</p> <p><b>Indicadores:</b></p> <p>Concentración de 25, 50, 100,150 y 200 µg/mL.</p> <p><b>Variable dependiente.</b></p> <p>Actividad antioxidante</p> <p><b>Indicadores:</b></p> <p>La actividad antioxidante: porcentaje (%) de captación de radicales libres.</p>	<p><b>Tipo de Investigación.</b></p> <p>Básico- Descriptivo.</p> <p><b>Régimen de Investigación.</b></p> <p>Libre</p> <p><b>La población.</b> La población estará constituida por tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua", que crece en el distrito de Chiara, ubicada a 3 515 m. s. n. m. provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.</p> <p><b>La muestra</b> Constituida por 6 kg de tres ecotipos del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua".</p> <p><b>Unidad experimental:</b> Un tubérculo de cada ecotipos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. &amp; P. "mashua".</p> <p><b>Técnica:</b></p> <p><b>Actividad Antioxidante</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidraizil (DPPH)</li> <li>Método reacción con el radical 2,2'azino-bis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS)</li> </ul> <p><b>Análisis de Datos:</b> Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95% y como método de comparación entre los tratamientos se realizará con la prueba de Tukey.</p>

