



UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA

# DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE IN VITRO DEL *Lepidium peruvianum* Chacón (MACA)



Tesis para optar el título profesional de Químico-Farmacéutico



**Juan G. Rosas B.Sc.**

**Director: Alejandro Pino Figueroa M.Sc.**

Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica



Arequipa - Perú  
2003

UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“DETERMINACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE IN VITRO  
DEL *Lepidium peruvianum* Chacón (MACA) AREQUIPA  
2003”**

Tesis presentada por el Bachiller:

**Rosas Portugal, Juan Guillermo**

**Para optar el título profesional de  
Químico Farmacéutico**

**Asesor: Mgter. Alejandro Pino Figueroa**

**AREQUIPA – PERÚ**

2004

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein (1879-1955)

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>SUMMARY</b> .....	8
<b>INTRODUCCION</b> .....	12
<b>HIPOTÉSIS</b> .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>CAPITULO I</b>	
<b>MARCO TEORICO</b> .....	22
1.- <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. (Maca) .....	23
1.1.- Descripción General: .....	23
1.2.- Clasificación taxonómica .....	24
1.3.- Ecotipos principales .....	25
1.4.- Composición Química .....	26
1.4.1.- Compuestos Nitrogenados .....	26
2.- RADICALES LIBRES.....	32
2.1.- Introducción:.....	32
2.2.- Radicales libres y Especies Reactivas Relacionadas .....	36
2.3. Defensa antioxidante,.....	38
2.4.- Antioxidantes Naturales Conocidos .....	41
2.4.1.- Carotenoides.....	41
2.4.2.- Ascorbatos .....	42
2.4.3.- Tocoferoles.....	43
2.4.4.- Retinoides.....	46
2.4.5.- Fenoles .....	47
2.4.6.- Flavonoides .....	48
2.4.7.- Catecolestrogenos.....	49
3.- SOLUBILIZACION POR COPRECIPITACION .....	51
3.1.- Solubilización.....	51
3.2.- Coprecipitación .....	51
3.2.1.- Fundamento de la coprecipitación.....	52
3.2.2.- Requisito del polímero coprecipitante.....	52
3.2.3.- Fases de la coprecipitación .....	52
3.3.- Polivinilpirrolidona(Povidona).....	53
3.3.1.- Obtención.....	54

3.3.2.- Propiedades Físicas.....	55
3.3.3.- Propiedades Biológicas.....	56
4.- 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH).....	58
4.1.- Descripción .....	58
<b>CAPITULO II</b>	
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>61</b>
1.- MATERIAL .....	62
1.1.- Material Biologico .....	62
1.2.- Ambientes de trabajo.....	62
1.3.- Equipos, materiales de laboratorio y reactivos .....	62
2.- METODOS.....	64
2.1.- Preparación de la muestra de maca .....	64
2.2.- Preparación del extracto acuoso de maca .....	65
2.3.- Preparación del extracto etanólico y clorofórmico de maca .....	66
2.4.- Preparación de los eritrocitos .....	68
3.- EXPERIMENTAL .....	69
3.1.- Experimental de la hemólisis.....	69
3.2.- Experimentación con extractos de maca.....	70
3.3.- Ensayo con vitamina E.....	72
3.4.- Ensayo con vitamina C.....	72
4.- ANALISIS ESTADISTICO .....	73
<b>CAPITULO III</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>75</b>
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>126</b>
<b>SUGERENCIAS .....</b>	<b>130</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>139</b>



# RESUMEN

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad realizar el estudio del efecto antioxidante in vitro de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico del *Lepidium peruvianum* Chacón. (Maca).

El método consistió en inducir la hemólisis en eritrocitos por medio de un iniciador de radicales libres como es el 2,2'-azobis(2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH), posteriormente se evaluó la liberación de hemoglobina por la ruptura de la membrana del eritrocito. En presencia de antioxidantes la cantidad de hemoglobina liberada es menor.

Las muestras de maca fueron: Harina cruda de maca (mezcla de varios ecotipos), Harina tostada de maca (mezcla de varios ecotipos), ecotipo maca amarilla, ecotipo maca blanca.

Una vez obtenidos los extractos orgánicos fueron solubilizados con polivinilpirrolidona (povidona), por un método de coprecipitación .

Las concentraciones con las que se trabajó fueron de  $7.5 \pm 1.2$ ,  $15 \pm 2.9$ ,  $30 \pm 4.4$ ,  $60 \pm 8.6$  y  $120 \pm 17.8$  mg/L de los extractos secos correspondientes.

El control se realizó con dos antioxidantes bien estudiados, Vitamina E y Vitamina C.

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por el método de Tukey demostrando que los extractos son iguales en su efecto antioxidante en comparación a los antioxidantes utilizados como control.

Las concentraciones con mayor efecto antioxidante fueron  $120 \pm 17.80$  mg/L. tanto para la harina cruda de maca (extracto acuoso y etanólico) como para la Harina tostada (extracto clorofórmico).

## RESUMEN

Se llegó a la conclusión que los extractos acuosos y etanólicos poseen mayor efecto antioxidante que el extracto clorofórmico.

Se demostró que los extractos del *Lepidium peruvianum* chacón (maca) disminuye la hemólisis.



# **SUMMARY**

## SUMMARY

The present research had a purpose to carry out the study of the antioxidant effect of the aqueous, ethanolics and cloroformic extracts from the *Lepidium peruvianum* in vitro.

The method consisted in inducing the hemolysis in erythrocytes by an initiator of free radicals as the 2,2'-azobis(2-amidinopropano) Diclorhidrato (so-called AAPH), furthermore on the hemoglobin liberation was evaluated spectrofotometricly. When antioxidants are used the amount of hemoglobin liberation is less.

The samples were raw flour from maca (it mixes of several ecotypes), toasted flour from maca (it mixes of several ecotypes), ecotype roots yellow, ecotype roots white.

Once the organic extracts were obtained, these were solubilized with polyvinnylpirrolidone by co-precipitation method.

The concentrations used were  $7.5 \pm 1.2$ ,  $15 \pm 2.9$ ,  $30 \pm 4.4$ ,  $60 \pm 8.6$  y  $120 \pm 17.8$  mg/L from the corresponding extracts.

The control were two natural antioxidants well known, these were the Vitamin E and Vitamin C.

The results of antioxidant effect were evaluated statistically by the method of Tukey, demonstrating that the extracts have antioxidant effect regarding the antioxidants control (Vitamin E and C).

Concentrations greater antioxidant effects were  $120 \pm 17.80$  mg/L for the raw flour from maca (aqueous and ethanolic extracts) and for the toasted flour (chloroformic extract).

## SUMMARY

In conclusion, the aqueous and ethanolic extracts possess more important antioxidant effect than the chloroform extracts.

It was demonstrated that the extracts from *Lepidium peruvianum* (maca) could decrease the hemolysis.



# **INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

La oxidación de los eritrocitos por un compuesto hidrosoluble iniciador de radicales libres produciendo hemólisis en eritrocitos ha sido ampliamente estudiada y es un método reconocido para evaluar el efecto antioxidante de determinadas sustancias.<sup>52, 53,60</sup>

El 2,2'- azobis(2-amidinopropano) Diclorhidrato (AAPH) es un iniciador de radicales libres y en soluciones acuosas puede producir hemólisis la cual es causada por radicales peroxilo principalmente. La hemólisis puede ser caracterizada por dos eventos principalmente como son la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas.<sup>52,53</sup>

No sólo la peroxidación lipídica y la oxidación proteica son los causantes de hemólisis ya que se ha demostrado que son eventos separados, se presume también que la oxidación de la espectrina puede desencadenar en la hemólisis.<sup>52</sup>

Los radicales peroxilo formados en la capa hidrofóbica de la membrana genera peroxidación lipídica principalmente de ácidos grasos insaturados. Se sabe que la Vitamina E y la Vitamina C suprimen la oxidación lipídica disminuyendo así la hemólisis, pero no pueden prevenir la oxidación de proteínas ni de impedir la hemólisis.<sup>26, 42, 47</sup>

Actualmente existe gran interés en la prevención de enfermedades causadas por radicales libres incluso el mismo envejecimiento oxidativo, cada vez más se incursiona en nuevos campos para lograr encontrar sustancias capaces de detener a los radicales libres; las investigaciones se están orientando más a productos naturales.

## INTRODUCCTION

Existen muchas plantas con efecto antioxidante reportadas es así que los aceites de *Glycine max* L (soya), *Gossypium barbadense* L (algodón), *Zea mays* L (maiz), *Roystonea regia* (palma real); los extractos de *Psidium guajaba* L. (guayaba), *Musa paradisiaca* L. (platano), *Pino cubertis* G. (pino), *Vitis vinifera* L. (uva), *Theobroma cacao* L. (cacao), *Mangifera indica* L., *Rosmavirus officinalis* L., *Malus sylvestris* M. entre otras, se les atribuye propiedades antioxidantes.

A la maca actualmente se le atribuyen milagrosos efectos y existen muchos más tal vez por descubrir, ya que es un producto que contiene varios componentes con efecto antioxidante conocido, es así el caso de minerales como el Zn y Mn, (cofactores de enzimas antioxidantes), metabolitos secundarios y vitaminas hidro y liposolubles.



# **HIPOTÉSIS**

## HIPOTESIS

Dado que la información etnofarmacológica y científica afirma que el *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” es revitalizante, energizante y antiestrés; es probable que presente efecto antioxidante in vitro (en eritrocitos).



# **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1. Determinar el efecto antioxidante de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico del *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” *in vitro* en eritrocitos.
2. Establecer las concentraciones de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico en la cual el *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” es antioxidante *in vitro*.
3. Comprobar el efecto antioxidante entre los diferentes productos del *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” de venta en la ciudad de Arequipa.



# **CAPITULO I**

## **MARCO TEORICO**

## 1.- *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Maca)

### 1.1.- Descripción General:

La maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp.), es un producto que se cultiva en los andes desde el tiempo de los incas en altitudes comprendidas entre 3 800 a 4 500 msnm. Actualmente su cultivo se ha reducido a los alrededores del Lago Chinchaycocha de la región Andres Avelino Cáceres, sub. Región Alto Andina.<sup>1</sup>

Esta planta alto andina, es uno de los pocos recursos con que cuentan los habitantes en las grandes alturas de la sierra del Perú; es resistente a granizadas, heladas, sequías prolongadas y a las enfermedades. Esta planta va a la vanguardia entre todos los cultivos alimenticios, debido a su alto valor nutritivo por lo que se hace merecedora a su gran difusión mediante los sistemas de promoción y extensión por medio de los servicios oficiales, universidades, centros de investigación que deben investigar científicamente sobre su mejoramiento genético y agronómico, para su explotación industrial en las grandes alturas, donde otros cultivos alimenticios no prosperan.<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup> Obregón Vilches, Lida. "**Maca**" *Planta Medicinal y Nutritiva del Perú*. Edit. Instituto de Fitoterapia Americana. 1997.

<sup>2</sup> Yllesca Gutierrez, María. *Estudio Fitoquímico y comparativo de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp "Maca" procedente de Carhuamayo (Junín)*. Catedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1994. (pag.103).

<sup>3</sup> Ciega de León, Pedro. *La Crónica del Perú*. Ediciones PEISA. Lima-Perú. 1973.

## 1.2.- Clasificación taxonómica

En 1843 Gerhard Walpers realiza la primera descripción científica de la especie *Lepidium Meyenii* Walp en base a un espécimen recolectado por el Sr. Meyenii en el Perú en el Dpto. de Puno, quedando sorprendido con la facilidad de reproducción de la planta en hábitats tan extremos. Posteriormente en 1989, Gloria Chacón propone para esta especie el nombre de *Lepidium peruvianum* Chacón sp.<sup>1</sup>

---

**Cuadro 1: División taxonómica del *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Maca)**

---

<b>Reino:</b>	Vegetal
<b>División:</b>	Fanerógamas
<b>Sub división:</b>	Angiospermas
<b>Clase:</b>	Dicotiledóneas
<b>Orden:</b>	Arquiclamideas
<b>Familia</b>	Rhoedales
<b>Género:</b>	Brassicaceae
<b>Especie:</b>	Lepidium
<b>Variedad:</b>	<i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.
<b>Nombre común:</b>	Maca, Maca Maca, Ayak chichita, Maka, Maino, Huto-huto, Ginseng peruano, Viagra peruano, Ayak willku, pepper weed, power root and herbal viagra.

---

Fuente: "Maca". Planta medicinal y nutritiva del Perú – Dra. Lida Obregón Vilches

### 1.3.- Ecotipos principales

La mayor parte de autores describen diferentes ecotipos de Maca, teniendo en cuenta el color externo de la raíz, las que presentan principalmente colores; amarillo, negro, rojo y morado; existen sin embargo sub-categorías descritas y que también han sido observados en trabajos de campo realizados en diferentes localidades de los departamentos de Junín y Pasco durante los últimos años.<sup>4,5,6,7</sup>



Figura 1. Diferentes ecotipos de la Maca.

---

<sup>4</sup> Rutsworoski de Diez Canseco, María. **Historia del Tahuantinsuyo**. 1992. (pág.332).

<sup>5</sup> Beltrán S. Hamilton; Baldón M. Severo; Carrillo F. Elida; Fuertes R. Cesar; Arroyo A. Jorge; Sandoval M. Soledad; Obregón V. Lida, **Estudio Botánico y Químico de los Ecotipos amarillo y morado del *Lepidium peruvianum* Maca. Evaluación de su toxicidad aguda**. Universidad Mayor de San Marcos. 1997.

<sup>6</sup> Weddell, H. A. **Plantas Inéditas de los Andes *Lepidium gelidium* Wedd.** Ann. Sci. Nat. 1984.

<sup>7</sup> Ganzera M, Zhao J., Mamad I, Khan IA. **Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyeii* (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography**. Chem. Pharm. 50(7) 988 –911 (2002).

Cuadro 2. Lista de ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (maca)

<b>Color externo de la raíz</b>	<b>Porcentaje</b>
Amarillo	47.8
Rojo-blanco	16.5
Morado-blanco	9.0
Blanco-rojo	6.3
Plomo	5.4
Negro	4.2
Rojo-amarillo	3.7
Blanco	2.2
Blanco-morado	1.6
Amarillo-rojo	1.3
Plomo-claro	0.8
Morado-plomo	0.7
Amarillo-plomo claro	0.5

Fuente: "Maca". Planta medicinal y nutritiva del Perú – Dra. Lida Obregón Vilches

#### 1.4.- Composición Química

##### 1.4.1.- Compuestos Nitrogenados

El tubérculo del *Lepidium peruvianum* Chacón sp (maca) contiene el derivado benzilado de 1.2–Dihidro-N-hidroxipiridina, llamada macaridina junto con el

alcaloide benzilado macamida: N-Benzil-5-oxo-6E, 8E-octadecadienamida y N-Benzilhexadecanamida.<sup>8</sup>

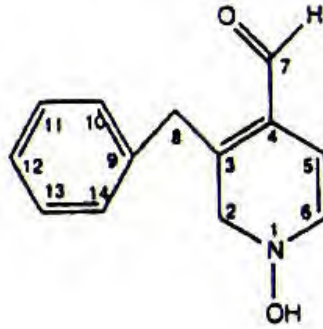


Figura 2. Derivado bencilado 1,2-dihidro- N-hidroxipiridina (Macaridina)

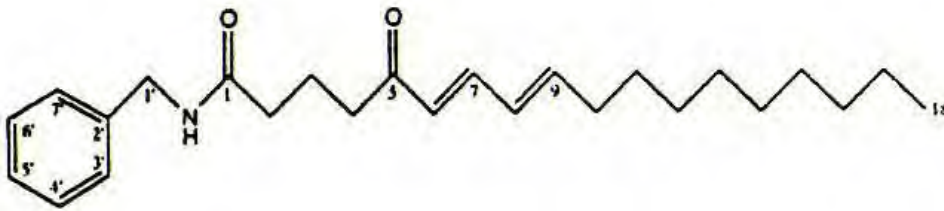


Figura 3. N-bencil-5-oxo-6E,8E-octadecadienamida (Macamida)

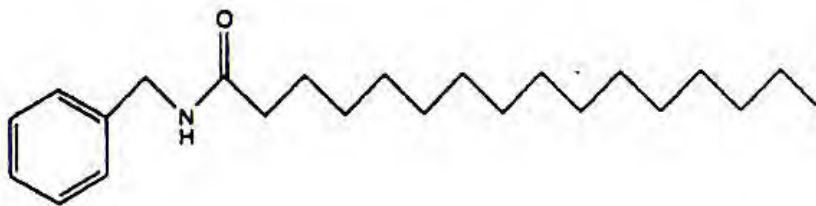


Figura 4. N-bencil hexadecanamida (Macamida)

<sup>8</sup> Muhammad I, Zhao J, Chuck D, Khan I. *Constituents of Lepidium meyenii (maca)*. Phytochemistry 59 (2002) 105-110.



Figura 5. Ácido 5-oxo-6E,8E-octadecadienoico (Macaeno)

Además contiene: glucosinolatos p-metoxibencil, esteroides y/o triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides y/o cumarinas, taninos, glucósidos, saponinas, amina alifática secundaria, aminas terciarias, almidón, fructosa, ácidos grasos y aceites naturales.( **Tabla 2**).<sup>1,3,5</sup>

Tabla 2. *Screening* Fitoquímico del *Lepidium peruvianum* Chacón sp.

<b>Componentes secundarios</b>
Saponinas
Terpenoides
Flavonoides
Alcaloides
Dextrinas
Antocianinas

Fuente: "Maca" Planta medicinal y nutritiva del Perú. Departamento de Nutrición de la UNA - La Molina

La maca contiene gran cantidad de vitaminas, es así que se encuentra presente la vitamina E y vitamina C en gran cantidad, también se encuentra vitaminas del complejo B (**Tabla 3**).

Tabla 3. Vitaminas presentes en el *Lepidium peruvianum* Chacón sp.

<b>Vitamina</b>	<b>Miligramos %</b>
Caroteno	0.07
Tiamina (B1)	0.15 – 1.17
Riboflavina (B2)	0.31 – 0.76
Ac. Ascórbico	0.80 – 3.52
Piridoxina (B6)	1.0
Cobalamina (B12)	125.0
Niacina	37.27 – 43.03

Fuente: “Maca” Planta medicinal y nutritiva del Perú. Departamento de Nutrición de la UNA - La Molina

La presencia de minerales hace que la maca sea un excelente revitalizante, contiene además de potasio y sodio; minerales que son cofactores enzimáticos importantes para el organismo, como son el cobre, magnesio y zinc (**Tabla 4**).

Tabla 4. Minerales presentes en el *Lepidium peruvianum* Chacón sp.

<b>Mineral</b>	<b>Miligramos/100 g(%)</b>
Calcio	220
Fósforo	180
Hierro	15.5
Manganeso	0.8
Cobre	5.9
Zinc	3.8
Sodio	18.7
Potasio	2050

Fuente: “Maca” Planta medicinal y nutritiva del Perú. Departamento de Nutrición de la UNA - La Molina

También podemos tomar en cuenta otro estudio realizado acerca de la composición del aceite esencial del *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Maca) el que fue obtenido de sus partes aéreas (hojas). Es así que se logró identificar 53 componentes dentro de los cuales encontramos 85.9% de fenil acetoniitrilo, 3,1% de benzaldehido y 2.1 % de 3-metoxifenilacetoniitrilo entre otros, pero en menor cuantía.<sup>9, 10, 11, 12</sup>

Un estudio químico-proximal se muestra en la **Tabla 5** y finalmente en la **Tabla 6** se aprecia los aminoácidos encontrados en el *Lepidium peruvianum* Chacón.<sup>13, 14, 15, 16</sup>

---

<sup>9</sup> Muhammad I., Zhao J., Chuck Dunbar D., Khan I. (2001). **Constituents of *Lepidium meyenii* "maca"**; National center for natural products research, research institute of pharmaceutical sciences, school of pharmacy, University of Mississippi.).

<sup>10</sup> Brako, Lois; Zaruchi, James: **Catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú**. Editorial Missouri Botanical Garden. 1994. Vol.45 (pag.1286).

<sup>11</sup> Chacon de Popovic, Gloria. **Análisis Cualitativo de los 33 elemento de la Maca (*Lepidium peruvianum*) y otros alimentos andinos del Perú**. Segundo Curso Nacional de Maca. Huancayo del 3-5 de diciembre de 1998.

<sup>12</sup> Chacon Roldan, Gloria. **Estudio Fitoquímico del *Lepidium meyenii* Walp**. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de ciencias de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1971 (pag 46).

<sup>13</sup> Instituto Nacional de Nutrición 1993. **Composición Química de los Alimentos Consumidos en el Perú**. Ministerio de Salud.

<sup>14</sup> Tellez M.R., Khan I., Kobaisy M., Schrader K., Dayan F., Osbrink W. (2001). **Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (maca)**;

<sup>15</sup> Aliaga C. Rolando. **La Maca (*Lepidium sp.*) recurso genético del Perú**, IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos "Oscar Blanco Galdós" del 22–25 de abril de 1997.

<sup>16</sup> Hickey E. Cordova Herrera. Ecología, **Uso y Conservación de la Maca en los Andes Centrales (Junin y Pasco)**. Escuela de Post-Grado. Universidad Agraria La Molina. 1993. (pag.111).

Tabla 5. Composición Química del *Lepidium peruvianum* Chacón sp.

<b>Componentes primarios</b>	<b>Porcentaje</b>
Humedad	5.00 – 19.62
Proteínas	10.00 – 18.25
Cenizas	3.46 – 6.43
Grasa	0.20 – 2.20
Fibra	3.85 – 8.50
Carbohidratos	51.81 – 76.05

Fuente: “Maca” Planta medicinal y nutritiva del Perú. Departamento de Nutrición de la UNA - La Molina

Tabla 6. Aminoácidos presentes en el *Lepidium peruvianum* Chacón sp.<sup>17</sup>

<b>Aminoácido</b>	<b>(mg/g.) de proteína</b>
Alanina	63.1
Arginina	99.4
Ácido aspártico	91.7
Glicina	68.3
Ácido glutámico	156.5
Histidina	21.9
Hidroxiprolina	26.0
Leucina	91.0
Lisina	54.5
Metionina	28.0
Fenilalanina	55.3
Prolina	0.5
Sarcosina	0.7
Serina	50.4
Treonina	33.1
Tirosina	30.6
Valina	79.3

Fuente: “Maca” Planta medicinal y nutritiva del Perú. Departamento de Nutrición de la UNA - La Molina

<sup>17</sup> Salas C. A. Vigor *Inducing Effect of Maca (Lepidium meyenii Walp), and Andean Hipocotil in Mice*. Universidad Peruana Cayetano Heredia (U.P.C.H). Perú. 1998.

## 2.- RADICALES LIBRES

### 2.1.- Introducción:

Cuando a mediados del año 1950, la Dra. Rebeca Gerschman proponía la teoría de la toxicidad de los radicales libres de oxígeno, levantó un viento de polémicas que se propagó por todos los círculos científicos del mundo. Gerschman adjudicaba a los radicales libres una relación estrecha con algunas patologías, tales como cáncer y envejecimiento, sin dejar de tener en cuenta algunas situaciones en que los radicales libres están muy comprometidos, tales como: arteriosclerosis, cataratas oculares, artritis, Parkinson, Alzheimer, infarto del miocardio, esclerosis lateral amiotrófica, displacia broncopulmonar y otras.<sup>18</sup>

La existencia de los radicales libres y su reconocimiento biológico tuvieron resistencia en los que sostenían y consideraban a la radiación X como reductora y al oxígeno como oxidante. Es recién en los últimos 10 años, que la teoría es universalmente aceptada y por consiguiente la maquinaria farmacéutica y cosmética ha comenzado con la búsqueda y fabricación de productos y formulaciones antirradicales libres.<sup>19</sup>

---

<sup>18</sup> Kandaswami C., Middleton E. *Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids, Free Radicals in Diagnostic Medicine. A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Armstrong D. Plenum Press, New York, 1994, 366 pp. 351–376.

<sup>19</sup> Bast A., Haenen G. R. M. M., *Zin en onzin van antioxidantia*, Pharm. Weekbl., 126 (1991) 600–605.

En la actualidad se admite que el proceso de envejecimiento se da bajo dos mecanismos básicos: uno de orden genético y el otro involucra a los procesos de oxidación por radicales libres.<sup>18</sup>

A la hora de explicar los procesos básicos que conducen al envejecimiento celular durante el aprovechamiento de oxígeno para obtener energía, la teoría se torna más que importante.<sup>19</sup>

El uso celular del oxígeno genera radicales libres en forma permanente, estas especies químicas son muy inestables y reactivas caracterizadas por la presencia de un electrón desapareado en la última órbita y su gran reactividad está asociada a la necesidad de tomar electrones para lograr su equilibrio y lo hace de cualquier estructura química que esté a su alcance. Generalmente éstas estructuras a las que apela el radical libre para su provisión electrónica son moleculares tales como proteínas, lípidos e inclusive el ADN, y por lo tanto alteran moléculas de importancia vital destruyendo mecanismos importantes del metabolismo.<sup>20</sup>

En cada mitocondria (órgano intracelular donde se genera la energía celular) una parte del oxígeno que llega a ella y escapa a la reducción completa, forma un radical libre de oxígeno; estructura altamente reactiva llamada anión superóxido, Una súper producción de éste anión produce la activación de algunas células fagocíticas (polimorfonucleares, monocitos y macrófagos). En

---

<sup>20</sup> Bast A., Haenen G. R., Doelman C. J., *Oxidants and antioxidants: state of the art*, Am. J. Med., 91 (1991) 2S-13S.

este caso la molécula superóxido (molécula de oxígeno con un electrón libre sin aparear) se convierte en agua oxigenada por la acción de la enzima SUPERÓXIDO DISMUTASA, ésta molécula de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) oxida los cloruros transformándolos en anión hipoclorito por medio de la enzima MIELOPEROXIDASA. Estos compuestos del oxígeno; peróxido de hidrógeno y anión hipoclorito, son agentes fuertemente oxidantes. Pero los blancos preferidos de los radicales libres son los lípidos de la membrana celular, en especial aquellos lípidos insaturados, éste ataque genera otros radicales libres y de esta manera se establece una reacción en cadena. (Figura 6).<sup>21, 22, 23, 24</sup>

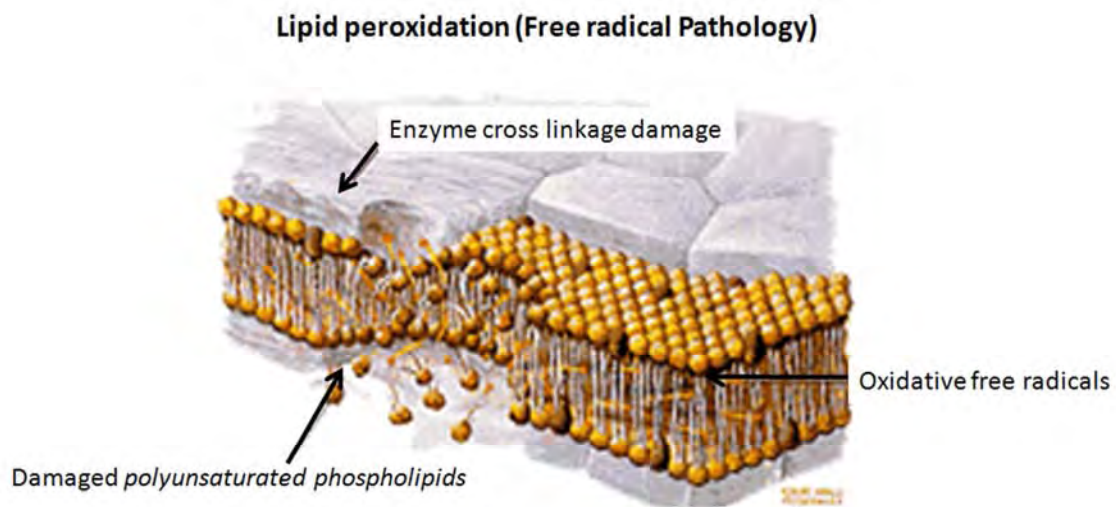


Figura 6. Reacción en cadena de peroxidación lipídica

<sup>21</sup> Shuker D. E., Atkin W., Bingham S. A., Leuratti C., Singh R., **Malondialdehyde–DNA adducts in relation to diet and disease risk—a brief overview of recent results**, IARC Sci. Publ., 156 (2002) 475–480.

<sup>22</sup> Halliwell B., **How to characterize an antioxidant: an update**, Biochem. Soc. Symp., 61 (1995) 73–101.

<sup>23</sup> Chaudiere J., Ferrari Iliou R., **Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms**, Food Chem. Toxicol. 37 (1999) 949–962.

<sup>24</sup> Evans P., Halliwell B., **Micronutrients: oxidant/antioxidant status**, Br. J. Nutr., 85 (Suppl. 2), (2001) S67–S74.

Entre los productos que se forman en esta reacción en cadena, están los hidroxiperóxidos lipídicos: R-O-OH, oxisteroles que son los productos de la oxidación del colesterol presente en la membrana y otros.

Uno de los procesos biológicos vitales que se ve afectado por los radicales libres es el de duplicación celular, ya que al alterarse el ADN se interrumpe este proceso. Los radicales libres modifican la estructura de los ácidos nucleicos, por ejemplo la transformación de la DESOXIGUANOSINA (dG) en 8-HIDROXIGUANOSINA (**Figura 7**). La relación de concentraciones entre: 8-OH-G/dG, se considera un marcador por excelencia del estado de daño permanente causado por los radicales libres sobre el ADN.<sup>25, 26, 27</sup>

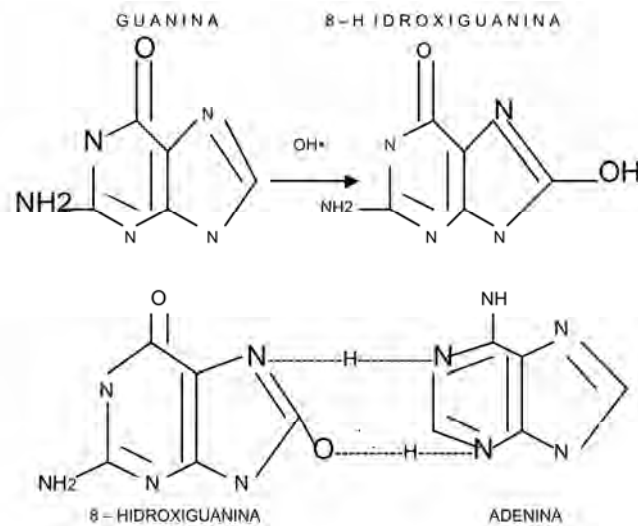


Figura 7. Transformación de la Guanina en 8-hidroxiguanina por medio de radicales libres.

<sup>25</sup> Noguchi N., Watanabe A., Shi H., *Diverse functions of antioxidants*, Free Radic. Res., 33 (2000) 809–817.

<sup>26</sup> Sies H., Stahl W., Sundquist A. R., *Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids*, Ann. NY Acad. Sci., 669 (1992) 7–20.

<sup>27</sup> Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Antioxidant defences*, Free Radicals in Biology and Medicine.

## 2.2.- Radicales libres y Especies Reactivas Relacionadas

El cuerpo humano se expone a un número grande de compuestos. La mayoría de estos compuestos no son dañinos, pero en la activación metabólica algunos pueden ser tóxicos. El oxígeno puede ser uno de estos compuestos. Durante el metabolismo del oxígeno, la mayoría se liga al hidrógeno durante la fosforilación oxidativa, mientras se forma agua. Sin embargo, el 4-5% del oxígeno consumido no se reduce completamente a agua, pero da origen a peróxido de hidrógeno o radicales libres. Un radical libre se define como cualquier especie capaz de existencia independiente que contiene uno o más electrones desapareados. Debido al electrón desapareado estas moléculas pueden ser muy reactivas.<sup>28</sup>

Las formas de oxígeno formadas son llamadas “especies de oxígeno reactivo” (ROS). Éste no sólo es un término colectivo para los radicales de oxígenos sino también para algún no-radical derivado de oxígeno reactivo. Además de los ROS también existen las especies de nitrógeno reactivo (RNS). Los ROS/RNS importantes son el radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, oxígeno singlete, y peroxinitrito. Estos compuestos tienen una reactividad diferente. El radical hidroxilo es el compuesto más reactivo; tiene una alta capacidad oxidante. Aunque el peróxido de hidrógeno es también un oxidante poderoso, este último es relativamente poco reactivo hacia la mayoría de sustratos biológicos a menos que esté presente en

---

<sup>28</sup> Evans P., Halliwell B., *Micronutrients: oxidant/antioxidant status*, Br. J. Nutr., 85 (Suppl. 2), (2001) S67–S74.

concentraciones fisiológicas altas.<sup>18,19</sup> Una lista de especies oxígeno reactivo y de nitrógeno se muestran en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Especies de Oxígeno reactivo y Nitrógeno reactivo<sup>18,19</sup>

	Radicales	No radicales
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Superoxido ( $O_2^-$ )	Hidrogeno peroxido ( $H_2O_2$ )
	Hidroxilo (OH)	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Peroxilo ( $RO_2$ )	Ácido hipobromoso (HOBr)
	Alloxilo (RO)	Ozono ( $O_3$ )
	Hidroperoxilo ( $HO_2$ )	Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	Oxido nitrico (NO)	Ácido nitroso ( $HNO_2$ )
	Dioxido de nitrógeno ( $NO_2$ )	Cation nitrosilo ( $NO^+$ )
	anión nitroxilo ( $NO^-$ )	
	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )	
	Ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ )	
	Alquil peroxinitrito ( $ROONO$ )	

a) anión superóxido: Es el radical libre madre, pues de él derivan todos los demás. La enzima de defensa superóxido dismutasa lo convierte en peróxido de hidrógeno.

b) Peróxido de hidrógeno: Este no es un radical libre, pero los genera, puede atravesar membranas celulares y producir reacciones en cadena. En presencia de metales forma el radical hidróxilo que es la especie más dañina.

c) Radical hidróxilo: Su período de vida media es de fracciones de segundo, pero en ese tiempo puede dañar el ADN, proteínas y enzimas; altera la membrana plasmática y destruyendo la célula.

d) Radical peróxilo: se origina en la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, su período de vida media es de 7 segundos y su zona de acción son las membranas celulares.

e) Anión hipocloroso: tampoco es un radical libre, pero es un poderoso oxidante que desnaturaliza las proteínas que participan en los procesos de respiración celular, destruye también el ADN. Este anión se forma a partir de los cloruros presentes en el citoplasma y el peróxido de hidrógeno.

### 2.3.- Defensa antioxidante,

Para proteger contra las acciones perjudiciales de los ROS y RNS, el cuerpo humano contiene una red de antioxidantes. El término antioxidante se ha definido como "cualquier sustancia que cuando esté presente a concentraciones bajas, comparadas con aquellos sustratos oxidables, retrasa significativamente o previene la oxidación de ese sustrato." <sup>22</sup> Los Antioxidante pueden ser clasificados por su función en categorías (**Cuadro 4**). <sup>23, 24, 25</sup> La primera categoría está formada por los antioxidante enzimáticos. Esta categoría de antioxidantes es diseñada por la naturaleza para cubrir con el radical superóxido y los radicales hidroperoxidos (peróxido de hidrógeno). El

radical superóxido es degradado por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno y oxígeno. La enzima catalasa puede degradar el peróxido de hidrógeno, y la enzima glutatión peroxidasa (GPX) degrada el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos. La segunda categoría se forma por los antioxidantes no enzimáticos y está compuesto de antioxidantes de pesos moleculares bajos que pueden ser divididos en hidrófilos (por ejemplo, la vitamina C, glutatión y flavonoides) y los antioxidantes hidrófobos (por ejemplo, carotenoides, la vitamina E, flavonoides, y ubiquinol-10). Se puede encontrar los antioxidantes hidrófilos en el citosol, mitocondria, y los compartimientos nucleares de las células, mientras los antioxidantes hidrófobos están presentes en las lipoproteínas y membranas. La cinética de la reacción de los antioxidantes no enzimáticos es muy rápida, mucho más rápida que las reacciones de ROS/RNS con otros blancos biológicos.<sup>27</sup>

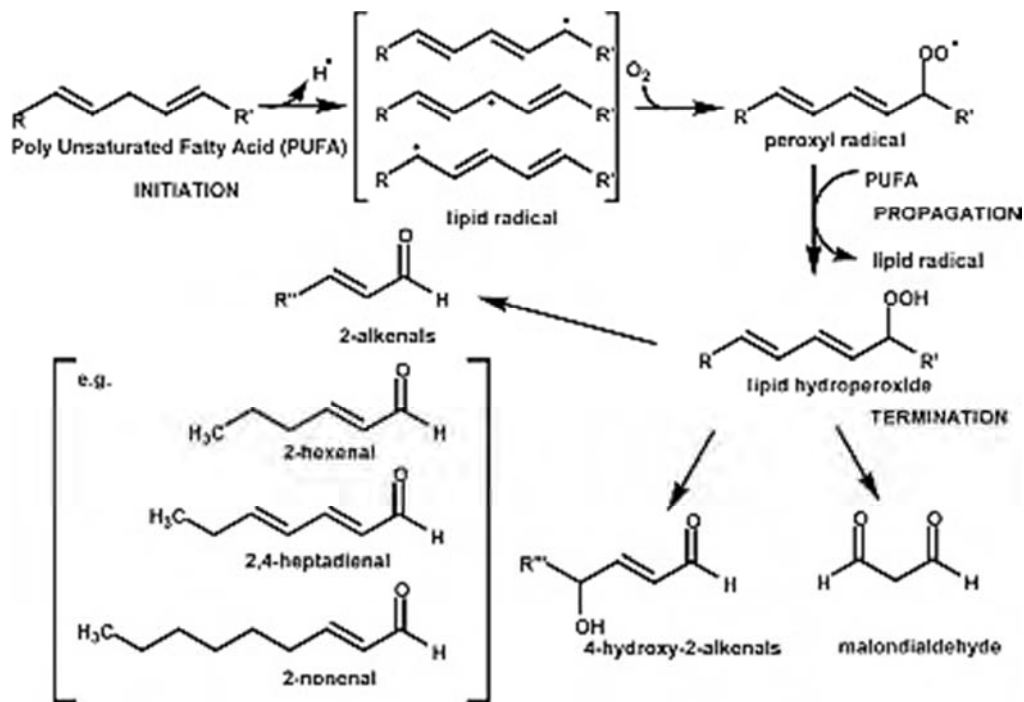


Figura 8. Proceso de peroxidación lipídica y formación de sustancias tóxicas.

Una tercera categoría de defensa de antioxidante se forma por los compuestos capaces de secuestrar metales de transición. Los restos de iones metálicos de transición como hierro y cobre pueden transformar el peróxido de hidrógeno en un radical del hidroxilo que es un compuesto fácilmente oxidable. Esta reacción se llama la reacción de Fenton [**Ec. (1)**] y es como sigue:



Las proteínas como la transferrina, ferritina, y ceruloplasmina previenen la formación de radicales hidroxilo separando los metales de transición.

La función global de los antioxidantes es actuar como una red coordinada y equilibrada para proteger los tejidos y fluidos del cuerpo del daño por los ROS y RNS. La perturbación del equilibrio entre los oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes es llamado estrés oxidativo.<sup>26</sup> Esto promoverá el daño a compuestos celulares importantes. Cuando este daño ocurre a un nivel relativamente bajo, el cuerpo puede reparar o reemplazar los substratos atacados con la ayuda de varios tipos de enzimas de reparación.<sup>28</sup>

Cuadro 4. Defensa antioxidante

<b>1.- Antioxidantes enzimáticos:</b>	<b><u>Reacción Enzimática</u></b>	
Superóxido dismutasa (SOD):	$2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	
Glutation <i>peroxidasa</i> (GPX):	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$	
	$2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$	
Catalasa:	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	
	<b><u>Hidrofílos</u></b>	<b><u>Hidrofobos</u></b>
	Vitamina C	Carotenoides
<b>2.- Antioxidantes no enzimáticos :</b>	Glutation	Vitamina E
	Flavonoides	Flavonoides
		Ubiquinol-10
	<b><u>Proteína</u></b>	<b><u>Ion Metal</u></b>
<b>3.- Secuestradores de iones metálicos de transición:</b>	Transferrina	Fe
	Ferritina	Fe
	Ceruloplasmina	Cu

Fuente: <sup>24, 25, 26</sup>

2.4.- Antioxidantes Naturales Conocidos

2.4.1.- Carotenoides

Los carotenoides son una clase bien caracterizada de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza y responsables del color brillante de varios frutos y vegetales. Algunos de los más de 600 carotenoides son bien conocidos, como el  $\beta$ -caroteno, el que es ampliamente utilizado como precursor de la vitamina A, colorantes alimenticios y aditivos alimenticios.<sup>29,30,31</sup> Los carotenoides son

<sup>29</sup> Mayne S. T.,  *$\beta$ -Carotene, Carotenoids, and Disease Prevention in Humans*, FASEB J., 10 (1996) 690–701.

removedores de radicales libres, y la acción antioxidante del  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides ha sido observada en sistemas in vitro e in vivo.<sup>32</sup> Sin embargo, los carotenoides no tienen rasgos estructurales comúnmente asociados con antioxidantes rompedores de cadenas.

#### 2.4.2.- Ascorbatos

Los ascorbatos son vitaminas esenciales que deben ser ingeridas de alimentos externos. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que las vitaminas antioxidantes en suficiente concentración inhiben enfermedades cardiacas y el cáncer. Sin embargo, hay una considerable incertidumbre acerca de los niveles óptimos de ingesta. Evidencia sustancial muestra que los ascorbatos pueden también actuar como oxidantes, dependiendo en el ambiente en el cual las moléculas estén presentes. Estos pueden inducir a muerte celular, fragmentación nuclear y hendidura internucleosomal del DNA en líneas de células humanas leucocíticas mielogénicas.<sup>33</sup> Más recientemente, se ha reportado que la suplementación dietética de 500 mg/día de vitamina C a voluntarios saludables en 6 semanas resultaron en efectos significativamente prooxidantes. Esto es ejemplificado con un aumento en linfocitos con típico

---

<sup>30</sup> Krinsky N. I., *Actions of Carotenoids in Biological Systems*, *Annu. Rev. Nutr.*, 13 (1993) 561–587.

<sup>31</sup> Sies H., Stahl W., *Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and Other Carotenoids as Antioxidants*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (Suppl), (1995) 1315S–1321S.

<sup>32</sup> Palozza P., *Prooxidant Actions of Carotenoids in Biological Systems*, *Nutr. Rev.*, 56 (1998) 257–265.

<sup>33</sup> Schwartz J. L., *The Dual Roles of Nutrients as Antioxidants and Prooxidants: Their Effects on Tumor Cell Growth*, *J. Nutr.*, 126 (1996) 1221S–1227S.

daño del DNA, mediado por radicales oxígeno como son la 8-oxoguanina y la 8-oxoadenina.<sup>34</sup>

Una hipótesis se pone adelante para explicar el efecto oxidativo del ascorbato y propone que el ascorbato extracelular es oxidado a deshidroascorbato el cual es rápidamente llevado dentro de las células por medio de un transportador de glucosa. El deshidroascorbato en el citosol es después reducido nuevamente a ascorbato, y, durante el proceso de reducción, los componentes celulares son oxidados (**Figura 9**).<sup>35, 36</sup>

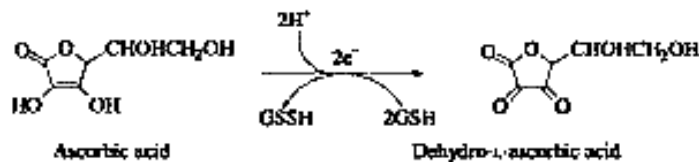


Figura 9. Reducción y oxidación de la vitamina C.

### 2.4.3.- Tocoferoles

La vitamina E, el mayor antioxidante lipofílico, de origen exógeno en tejidos, es el nombre colectivo para las ocho mayores moléculas naturales, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles, que contienen actividad biológica de  $\alpha$ -

<sup>34</sup> Iftikhar S., Lietz H., Mobarhan S., Frommel T. O., *In Vitro  $\beta$ -carotene Toxicity for Human Colon Cancer Cells*, *Nutr. Cancer*, 25 (1996) 221–230.

<sup>35</sup> Paolini M., Pozzetti L., Pedulli G. F., Marchesi E., Cantelli-Forti G., *The Nature of Prooxidant Activity of Vitamin C*, *Life Sci.*, 64 (PL) , (1999) 273–278.

<sup>36</sup> Song J. H., Shin S. H., Ross G. M., *Prooxidant Effects of Ascorbate in Rat Brain Slices*, *J. Neurosci. Res.*, 58 (1999) 328–336.

tocoferol. El  $\alpha$ -tocoferol es considerado generalmente el más importante antioxidante liposoluble en el plasma, lipoproteínas circulantes,<sup>37, 38</sup> y tejidos, mientras que el  $\gamma$ -tocoferol y tocotrienoles están presentes en estos tejidos pero en baja concentración.

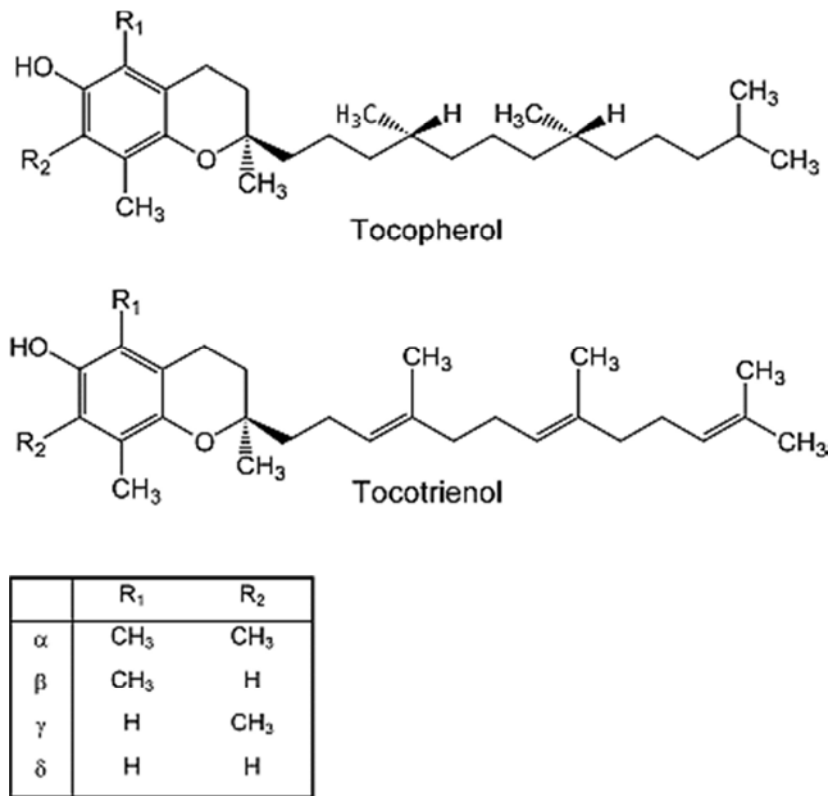


Figura 10. Formas de la Vitamina E.

<sup>37</sup> Zhang D., Okada S., Yu Y., Zheng P., Yamaguchi R., Kasai H., ***Vitamin E Inhibits Apoptosis, DNA Modification, and Cancer Incidence Induced by Iron-mediated Peroxidation in Wistar Rat Kidney***, *Cancer Res.*, 57 (1997) 2410–2414.

<sup>38</sup> Ciaccio M., Valenza M., Tesoriere L., Bongiorno A., Albiero R., Livrea M. A., ***Vitamin A Inhibits Doxorubicin-Induced Membrane Lipid Peroxidation in Rat Tissues in Vivo***, *Arch. Biochem. Biophys.* 302 (1993) 103–108.

MARCO TEORICO

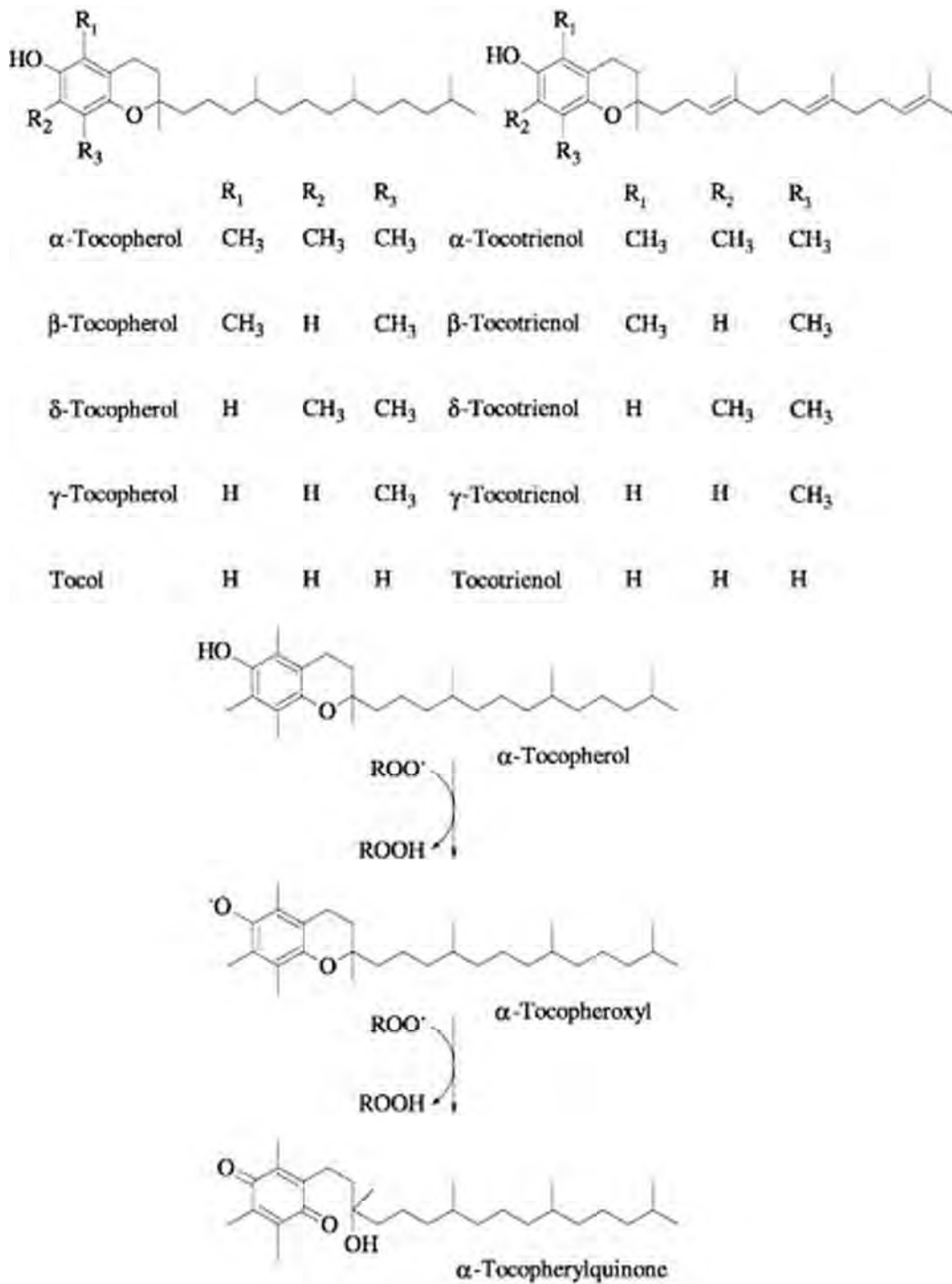


Figura 11. Estructura química de los grupos de vitamina E y vía metabólica del  $\alpha$ -Tocoferol.

#### 2.4.4.- Retinoles

Los Retinoles, son derivados metabólicos y sintéticos de la vitamina A, se ha demostrado que tienen función antioxidante efectiva e inhiben la peroxidación de PUFAs en la doble capa lipídica. Por ejemplo, varios retinoles inhiben la peroxidación de lípidos ascorbato-dependente y hierro-catalizada en hígado de rata y mitocondrias cerebrales. El palmitato de retinol presenta función antioxidante en corazón de rata y tejidos cerebrales.<sup>38</sup> Sin embargo, el ácido retinoico fue conocido por estimular la iniciación de 2,2-Azobis(2-Amidinopropano) autoxidación del ácido linoleico en micelas de sulfato dodecil de sodio, y esta observación puede contar para el efecto prooxidante del ácido retinoico en este sistema.<sup>39</sup> Adicionalmente, los posibles efectos de retinoles (por ejemplo la promoción del crecimiento del tumor), aumentan en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos, y la exacerbación de enfermedades autoinmunes preexistentes.<sup>40</sup>

---

<sup>39</sup> Freyaldenhoven M. A., Lehman P. A., Franz T. J., Lloyd R. V., Samokyszyn V. M., ***Retinoic Acid-Dependent Stimulation of 2,2'-Azo bis(2-Aminopropane)-Initiated Autoxidation of Linoleic Acid in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles: A Novel Prooxidant Effect of Retinoic Acid***, *Chem. Res. Toxicol.*, 11 (1998) 102–110.

<sup>40</sup> Bolton J. L., Pisha E., Shen L., Krol E. S., Iverson S. L., Huang Z., van Breemen R. B., Pezzuto J. M., ***The Reactivity Of O-quinones Which Do Not Isomerize to Quinone Methides Correlates with Alkylcatechol-Induced Toxicity in Human Melanoma Cells***, *Chem. Biol. Interact.*, 106 (1997) 133–148.

### 2.4.5.- Fenoles

Los fenoles son uno de los mayores grupos de componentes no esenciales en la dieta que han sido asociados con la inhibición de la aterosclerosis y cáncer.<sup>41, 42</sup>

La bioactividad de los fenoles ha sido relatado por su comportamiento antioxidante, el que es atribuido a sus habilidades para quelar metales, inhibir lipooxigenasas, y remover radicales libres. (**Figura 8**). También, los polifenoles reducen metales, de esta manera aumentando su habilidad para formar radicales libres peróxidos.<sup>43</sup>

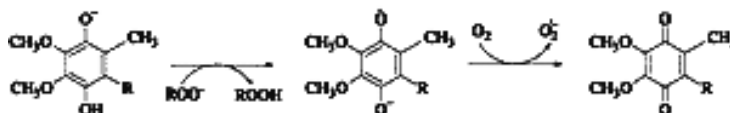


Figura 12. Función antioxidante de la ubiquinona.

<sup>41</sup> Morgan J. F., Klucas R. V., Grayer R. J., Abian J., Becana M., **Complexes of Iron With Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties**, *Free Radical Biol. Med.*, 22 (1997) 861–870.

<sup>42</sup> Decker E. A., Phenolics: **Prooxidants or Antioxidants**, *Nutr. Rev.*, 55 (1997) 396–407.

<sup>43</sup> Sergediene E., Jnsson K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Rietjens I. M.C.M. **Prooxidant Toxicity of Polyphenolic Antioxidants to HL-60 Cells: Description of Quantitative Structure-activity Relationships**, *FEBS Lett.*, 462 (1999) 392–396.

#### 2.4.6.- Flavonoides

Los flavonoides, específicamente, aquellos como los grupos catecol o pirogalol, obviamente están expuestos a reacciones de autoxidación.<sup>44</sup> Los fenoles primarios (ácidos fenólicos) y flavonoides son capaces de reducir el ion férrico a ferroso y son capaces de quelar y alterar la actividad catalítica del hierro. La mayoría de ensayos con fenoles fueron también capaces de inhibir la oxidación de micelas del ácido linoleico, la oxidación (catalizada por el ion ferroso) de síntesis de glutamina, presumiblemente por la remoción de radicales libres y llevarse el ion de sitios catalíticos por quelación. Aunque los flavonoides inhiben la oxidación en sistemas por cierto, ellos no protegen contra toda forma de daño oxidativo.

La Quercetina, un flavonoides altamente estudiado tiene el potencial de inhibir el proceso de radicales libres en células por a) remover el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, b) bloqueo de la peroxidación lipídica c) reaccionando con el peroxilo o radicales peroxilo de lípidos, d) inhibiendo la formación de OH<sup>-</sup>, e) quelando iones Hierro. Los efectos biológicos de la quercetina se creen es resultado por sus propiedades antioxidantes.<sup>45</sup>

---

<sup>44</sup> Yamanaka N., Oda O., Nagao S., Prooxidant Activity of Caffeic Acid, *Dietary Non-flavonoid Phenolic Acid, on Cu<sup>2+</sup>-Induced Low Density Lipoprotein Oxidation*, *FEBS Lett.*, 405 (1997) 186–190.

<sup>45</sup> Metodiewa D., Jaiswal A. K., Cenas N., Dickanaité E., Segura-Aguilar J., *Quercetin May Act as a Cytotoxic Prooxidant after its Metabolic Activation to Semiquinone and Quinoidal Product*, *Free Radical Biol. Med.*, 26 (1999) 107–116.

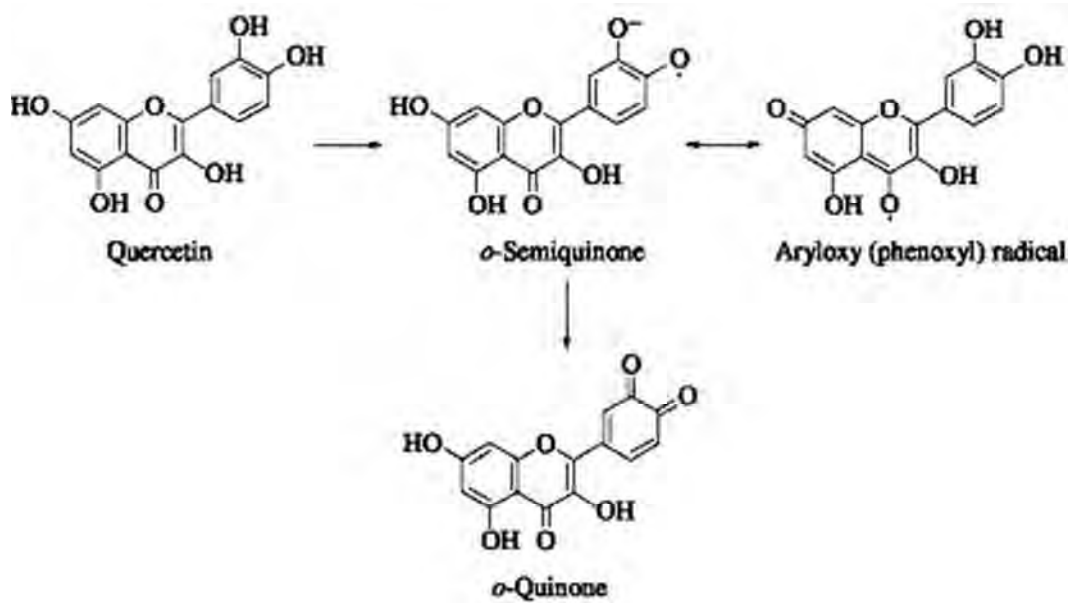


Figura 13. Esquema simple de la activación oxidoreductiva de la quercetina.

#### 2.4.7.- Catecolestrogenos

Las propiedades antioxidantes de los estrógenos han sido demostradas en muchos estudios in Vitro e in vivo.<sup>46, 47, 48</sup> Por ejemplo, los estrógenos inhiben la oxidación del LDL, la peroxidación de lípidos, y la oxidación del colesterol. La administración del 17 β-estradiol por ovariectomía en cerdos inhibió la oxidación del LDL. Estos efectos han sido también observados en mujeres posmenopáusicas después de la administración de 17 β-estradiol. Estas

<sup>46</sup> Dubey R. K., Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Gillespie D. G., Branch R. A., Jackson E. K., Kagan V. E., **Estrogen and Tamoxifen Metabolites Protect Smooth Muscle Cell Membrane Phospholipids Against Peroxidation and Inhibit Cell Growth**, *Circ. Res.*, 84 (1999) 229–239.

<sup>47</sup> Kühn-Velten W. N., Pippirs U., **Novel Connections Between NADPH-Induced Lipid Peroxidation and Cytochrome P450 Inactivation, and Antioxidant and Enzyme Protective Properties of Estradiol in Gonadal Membranes**, *Free Radical Res.*, 26 (1997) 125–133.

<sup>48</sup> Bolton J. L., Shen L., **P-quinone Methides Are the Major Decomposition Products of Catechol Estrogen O-quinone**, *Carcinogenesis*, 17 (1996) 925–929.

actividades antioxidantes de los estrógenos explicarían la baja tasa de enfermedades cardiacas en mujeres posmenopáusicas tratadas con estrógenos, comparado con los hombres.<sup>49</sup>

Los estrógenos pueden mostrar también actividad pro o antioxidante dependiendo de la naturaleza de sus metabolitos y concentración (**Figura 14**). Concentraciones farmacológicas de hormonas o sus metabolitos tienen propiedades antioxidantes. Este mecanismo inhibitorio puede ser base en la acción para remover radicales libres del estrógeno. En contraste, el 2- o 4-hidroxiestradiol realiza la oxidación del LDL por disminución del tiempo de retraso de la peroxidación lipídica por 40–50% comparado al valor control en la ausencia de estrógeno.<sup>50</sup>

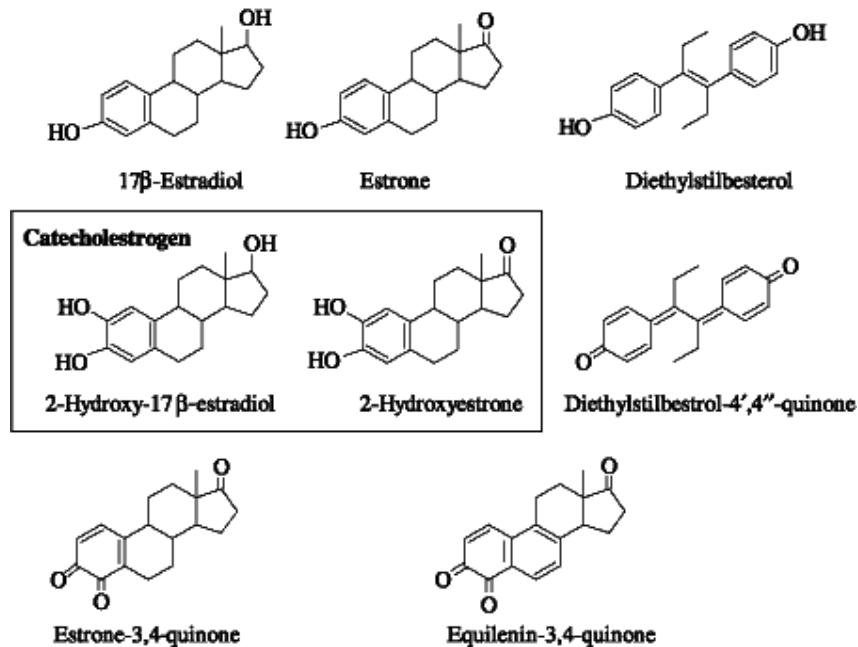


Figura 14. Metabolitos del estrógeno.

<sup>49</sup> Lacort M., Leal A. M., Liza M., Martín C., Martínez R., Riuz-Larrea M. B., *Protective Effect of Estrogens and Catecholestrogens Against Peroxidative Membrane Damage in Vitro*, *Lipids*, 30 (1995) 141–146.

<sup>50</sup> Markides C. S.A., Roy D., Liehr J. G., *Concentration Dependence of Prooxidant and Antioxidant Properties of Catecholestrogens*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 360 (1998) 105–112.

### 3.- SOLUBILIZACION POR COPRECIPITACION

#### 3.1.- Solubilización

La solubilización es una operación que consiste en preparar una solución termodinámicamente estable, y fisicoquímicamente homogénea, a partir de una sustancia insoluble o muy poco soluble en el disolvente utilizado.

Con frecuencia se usa el término hidrotropía para designar fenómenos de solubilización en agua, y se le define como la facultad que tienen ciertas sustancias de hacer que se disuelvan en agua sustancias insolubles, sin alterar las propiedades químicas de estas <sup>51</sup>.

#### 3.2.- Coprecipitación

La coprecipitación es un método de solubilización en agua, que se caracteriza por la obtención de una disolución sólido-disolvente-sólido de nominada coprecipitado, que contiene una droga insoluble o poco soluble. Este coprecipitado puede dispersarse en agua en forma homogénea y estable, haciendo posible la disolución de la droga contenida.

El disolvente sólido, generalmente es un polímero natural o sintético, y su selección depende de las características de la sustancia que se va a solubilizar y de las características del producto final.

### 3.2.1.- Fundamento de la coprecipitación

Se basa en la unión entre una droga poco o nada soluble en agua y un polímero hidrosoluble, de tal manera que éste actúa como transportador de aquella frente a la acción disolvente del agua. Las propiedades químicas de la droga no se alteran. La unión droga-polímero se realiza a nivel molecular y es necesario que previamente ambas sustancias se encuentren dispersadas a este nivel en un disolvente común.

### 3.2.2.- Requisito del polímero coprecipitante

- Ser muy soluble en agua
- Tener capacidad para formar uniones reversibles con la droga que va a solubilizar.
- Ser soluble en otros disolventes no acuosos en los que sí es soluble la droga.
- Ser farmacotécnicamente inerte.
- No producir incompatibilidades.
- Ser farmacológicamente inerte.

### 3.2.3.- Fases de la coprecipitación

Fase I: Preparación de una solución del polímero solubilizante y la droga difícilmente soluble en agua en un solvente no acuoso, de tal manera que se

asegura la dispersión molecular de ambas sustancias. Es recomendable que el polímero se encuentre en mayor cantidad con respecto a la droga.

Fase II: el disolvente no acuoso se elimina por evaporación o por secado por pulverización; en esta fase, a medida que se evapora el disolvente, las moléculas del polímero van enlazando a las moléculas de la droga, produciéndose la interacción de ambos. El residuo seco es el coprecipitado y la temperatura y presión de la evaporación dependen de la naturaleza de la droga y del polímero.

Fase III: es la obtención de una solución acuosa con el coprecipitado obtenido; aquí, el mecanismo de disolución se realiza entre el agua y el polímero. Estas soluciones, generalmente coloidales, son homogéneas y estables, y se les puede utilizar en la preparación de formas farmacéuticas.

### 3.3.- POLIVINILPIRROLIDONA.

También llamada Povidona es un polímero sintético de naturaleza imidica que consiste esencialmente de grupos lineales de 1-vinil-2-pirrolidona y producida comercialmente como series de productos que tienen pesos moleculares medios clasificados desde 2 500 hasta 1 100 000 que dependen del grado de polimerización o número de monómeros contenidos en el polímero.<sup>51</sup>

---

<sup>51</sup> Pino A., Araujo L. *Preparación de soluciones acuosas con Povidona, a partir de soluciones extractivas vegetales y la comprobación de su efecto farmacológico en ratas*. Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica UCSM 1987

3.3.1.- Obtención

El 1,4-butanodiol obtenido de la síntesis de butadieno (síntesis de Reppe) es deshidrogenado con la ayuda de cobre a 200°C, formando  $\gamma$ -butirolactona, la cual se hace reaccionar con amoníaco para formar 2-pirrolidona. Subsecuente se trata con acetileno originando monómeros de vinilpirrolidona (**Figura 14**). La polimerización es llevada a cabo por calentamiento presencia de peróxido de hidrogeno y amoníaco.

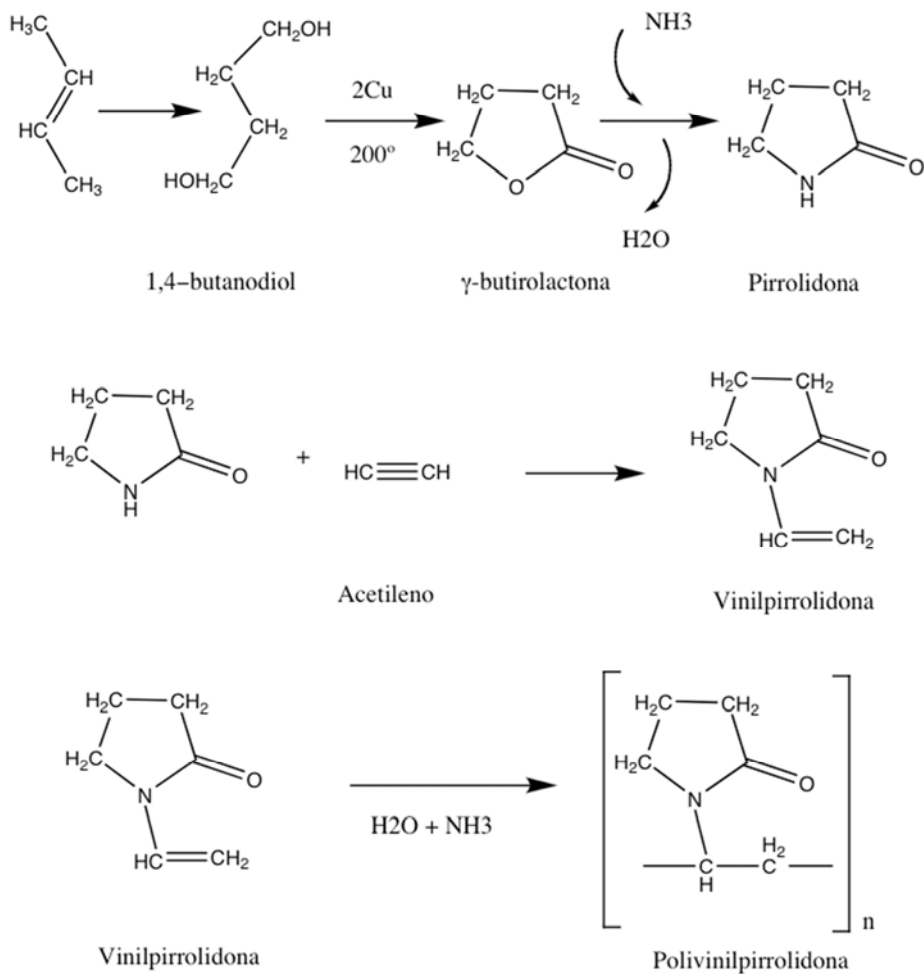


Figura 14. Síntesis de polivinilpirrolidona

### 3.3.2.- Propiedades Físicas

#### 3.3.2.1.- Características Organolépticas.

Polvo fino de buen deslizamiento.

Color blanco o ligeramente amarillo semejante al de la albúmina.

Posee un olor propio, débil y característico.

Es prácticamente insípida.

#### 3.3.2.2.- Solubilidad

Es bien soluble en agua, dando una solución coloidal; pero las soluciones mantenidas alrededor de los 50°C eventualmente se precipitan.

Es igualmente soluble en alcohol, cloroformo y otros disolventes que tengan polaridad.

Es insoluble en éter, benceno, aceites minerales y otros disolventes no polares

**(Cuadro 5)**

Cuadro 5. Solubilidad de la Povidona en diferentes disolventes

SOLUBLE	INSOLUBLE
• Agua	• Acetato de etilo
• Metanol	• Acetona
• Etanol absoluto	• Dioxano
• n-propanol	• Dietiléter
• isopropanol	• Pentano
• n-butanol	• Ciclohexano
• ciclohexanol	• Benceno
• cloroformo	• Tetracloruro de carbono
• cloruro de metileno	• Éter de petróleo
• dicloruro de etilo	• Tolueno
• glicerina	• Xileno
• dietilenglicol	• Aceite mineral
• trietanolamina	
• ácido fórmico	
• ácido acético	
• ácido propionico	
• otros	

Fuente: Preparación de soluciones acuosas con Povidona, a partir de soluciones extractivas vegetales y la comprobación de su efecto farmacológico en ratas.<sup>51</sup>

### 3.3.3.- Propiedades Biológicas

Es farmacológicamente inerte según estudios realizados en minerales y hombres. Administrada tanto por vía oral, la Povidona es muy bien tolerada. La toxicidad aguda por ingestión es DL<sub>50</sub>: 15-25g/Kg de peso corporal en ratas blancas y cobayos. La toxicidad intravenosa aguda es DL<sub>50</sub>: 12-15g/Kg de peso en ratas blancas y cobayos. La toxicidad crónica fue investigada alimentando

ratas albinas con 1-10% de Povidona en la dieta durante un periodo hasta de 24 meses, sin observarse ningún efecto anatomopatológico importante atribuible a la Povidona.

Los estudios en la piel por su empleo tópico, mostraron que la Povidona no es ni irritante primario ni sensibilizador.

La Povidona es bien tolerada por las mucosas, según ensayos realizados sobre el ojo de conejo.

La Povidona no desarrolla acción embriotóxica o teratogénica, ni mutagénica.

La absorción de la Povidona por vía oral, es parcial, dependiendo del peso molecular del polímero administrado.

La eliminación de la Povidona es por vía renal, siendo más rápidamente eliminada del organismo la Povidona de bajo peso molecular.

#### 3.3.4.- Aplicaciones de la povidona

- Solubilizante
- Anticristalizante
- Estabilizador de suspensiones
- Aglutinante para tabletas

- Grageificante y filmógeno
- Desintegrante de tabletas
- Espesante
- Antiirritante
- Estabilizador de espuma

#### 4.- 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH)

##### 4.1.- Descripción

El AAPH es un compuesto AZO soluble en agua el cual es usado extensamente como un generador de radicales libres, también en la peroxidación de lípidos y en la caracterización de antioxidantes. La descomposición del AAPH produce nitrógeno molecular y dos radicales carbono. Los radicales carbono pueden combinarse para producir productos estables o reaccionar con moléculas de oxígeno y formar radicales peroxilos (**Figura 16**). La vida media del AAPH es alrededor de 175 horas (37°C a pH neutral), dando una tasa de generación de radicales libres esencialmente constante durante las primeras varias horas en solución. También el AAPH puede ser usado efectivamente para la peroxidación lipídica en una dispersión





**CAPITULO II**  
**MATERIALES Y**  
**METODOS**

## 1.- MATERIAL

### 1.1.- Material Biológico

#### 1.1.1 *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Maca)

Las raíces de maca fueron recolectadas de cultivos de zonas alto andinas (Junín y Pasco), durante los meses de diciembre de 2003. Se tomó las variedades amarilla, blanca así como también se adquirió harina cruda de maca y harina tostada de maca de la Feria el Altiplano.

#### 1.1.2 Células sanguíneas

Para el experimento se preparó una suspensión de eritrocitos, los cuales fueron tomados de un voluntario aparentemente sano.

### 1.2 Ambientes de Trabajo

Laboratorio de Control de Calidad H-205 de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa.

### 1.3 Equipos, materiales de laboratorio y reactivos

#### 1.3.1 Equipos

- Espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu UV-216)
- Centrifuga (IEC CENTRA CL2)
- Baño María (Memmert)

- Balanza Analítica (Denver Instrumental Company A – 160)
- Cocina eléctrica (Gallenhamp)

### 1.3.2 Material de Laboratorio

- Tubos de ensayo de 15 x 100 mm pirex
- Beaker de 250 ml (Kimax)
- Fiolas de 25, 50, 100, 1000 ml (Kimax)
- Pipetas de 0.5, 1, 5, 10 ml
- Micropipetas graduadas de 100 – 1000 uL

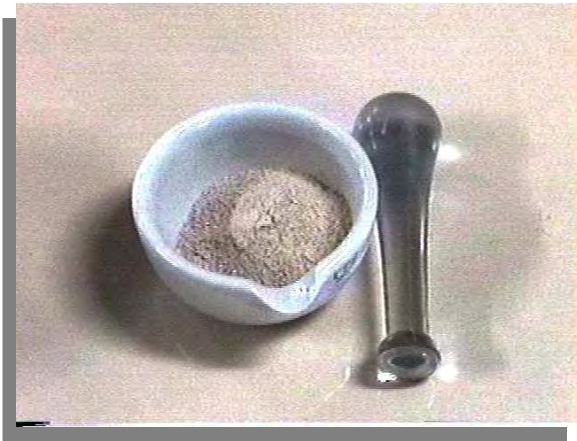
### 1.3.3 Reactivos

- AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) Diclorhidrato) (ALDRICH)
- Cloruro de sodio (MERCK)
- Fosfato ácido dipotasico (MERCK)
- Polivinilpirrolidona PVP

## 2. METODOS

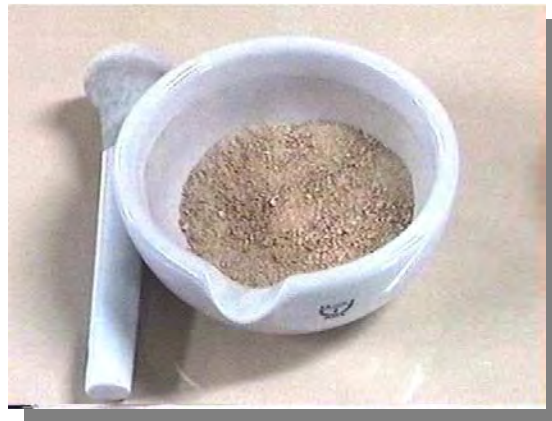
### 2.1 .- Preparación de la muestra de maca

Luego de ser recolectada la muestra, esta se sometió a rallado artesanal y luego fue secada para posteriormente ser pulverizada hasta obtener una harina uniforme, este procedimiento se repitió para cada ecotipo (**Figuras 17- 20**).



**Figura 17.** Ecotipo Maca blanca.

**Figura 18.** Ecotipo Maca amarilla.





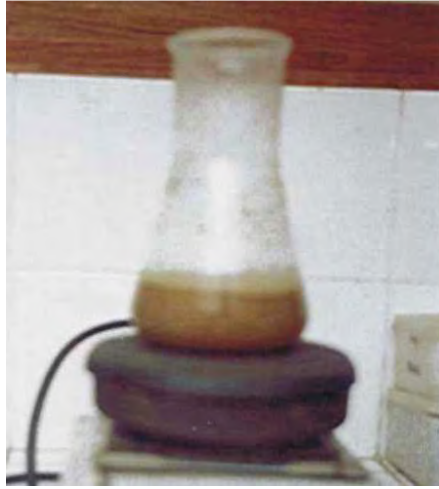
**Figura 19.** Harina cruda de Maca.

**Figura 20.** Harina tostada de Maca.



## 2.2.- Preparación del extracto acuoso de maca

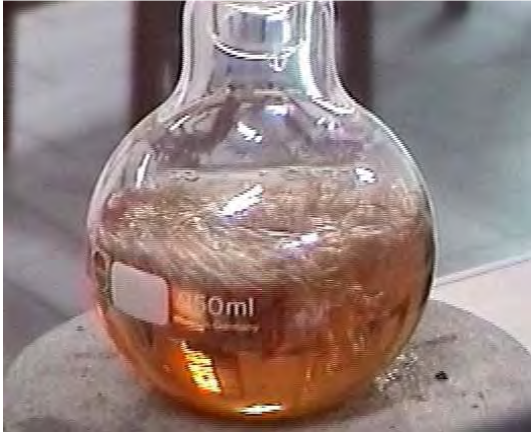
Para obtener el extracto acuoso se usó el método de cocimiento el cual consistió en pesar 1g de muestra (harina de maca cruda, harina de maca tostada, harina cruda de maca amarilla, harina cruda de maca blanca), se colocó con 50mL de agua destilada y se dejó hervir durante 30 minutos manteniendo el volumen constante, una vez obtenido el extracto es filtrado y centrifugado hasta obtener una solución cristalina (**Figura 21**).



**Figura 21.** Extracto acuoso

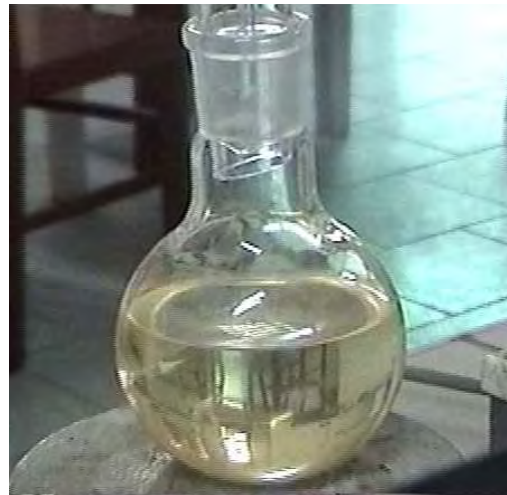
### 2.3.- Preparación del extracto etanólico y clorofórmico de maca

Para obtener el extracto etanólico y clorofórmico seco de maca se usó el método de Soxhlet que consistió en pesar 10g de muestra (harina de maca cruda, harina de maca tostada, harina cruda de maca amarilla, harina cruda de maca blanca), se colocó en el balón 200mL de alcohol de 96° y cloroformo, y se sometió a extracción por 4 horas. Obteniéndose así cuatro extractos (**Figuras 22 y 23**).



**Figura 22.** Obtención de Extracto etanólico de la harina cruda de maca.

**Figura 23.** Obtención de Extracto cloroformico de la harina cruda de maca.



Una vez obtenido el extracto etanólico, se sometió a un proceso de solubilización por coprecipitación con povidona (PVP) <sup>51</sup> en proporciones que oscilaron entre 1:7 y 1:10 para algunos casos, luego se llevó al rotavapor para su concentración y se terminó de evaporar a baño María (**Figuras 24**), obteniéndose un residuo seco el cual fue pulverizado en un mortero para posteriormente ser utilizado en la preparación de soluciones acuosas.



**Figura 24.** Concentracion del Extracto en el rotavapor hasta polvo.

#### 2.4.- Preparación de los eritrocitos

Una vez obtenida la sangre en tubos con EDTA como anticoagulante, se procedió a la purificación de eritrocitos. Los eritrocitos fueron separados del plasma y lavado tres veces con 10 vol. Suero fisiológico (0.15 M NaCl). Durante la última lavada, las células fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos y refrigeradas inmediatamente hasta el ensayo que no debe de ser mas de 24 horas (**Figura 25**).



**Figura 25.** Separación de los eritrocitos por centrifugación.

### 3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.1.- Diseño experimental de la hemólisis

Preparar una suspensión de eritrocitos al 20% en una solución salina (125 mM NaCl y 10mM de Buffer fosfato sodio (pH = 7.4)) al cual se le agregará una solución del compuesto AZO, AAPH; en 10mM buffer fosfato salino la cual será a diferentes concentraciones y se llevara a un volumen final de 6mL. Los eritrocitos se preincubaran a 37°C por 5 min. antes de añadirle la solución de AAPH. La mezcla fue agitada suavemente durante un tiempo de incubación a 37°C por 240 minutos, el desarrollo de la hemólisis fue determinada espectrofotométricamente a intervalos específicos. Se tomaron 2mL de la mezcla y se centrifugaron por 10 minutos a 2500 rpm, posteriormente del sobrenadante, se tomó una alícuota de 300µL los cuales se diluyeron en 3mL de 0.15 M NaCl y llevado al espectrofotómetro.

La absorción A (absorbancia de la muestra) del sobrenadante se leerá a 540 nm. Se tomó el valor máximo de los tubos tratados con AAPH como completa hemólisis de absorción B (máxima absorbanciaa 74mM de AAPH), después de centrifugación se evaluará a 540 nm. El porcentaje de hemólisis fue calculado de la relación de las lecturas **(A/B) x 100**. Los experimentos se repetirán por lo menos tres veces. Los datos tienen que ser reproducibles dentro del 5% y sólo se mostrará los valores promedio.

Realizar un ensayo de hemólisis con AAPH a diferentes concentraciones para determinar la concentración ideal. La mezcla consiste en 20% de suspensión de eritrocitos en 10mM buffer salino fosfato (pH = 7.4) con las concentraciones de AAPH de: 0, 4, 18, 37, 55 y 74mM<sup>51</sup> y llevados a incubación a 37°C con agitación suave por un tiempo total de 240 minutos y tomar un muestra a determinados tiempos que fueron: 120, 180 y 240 minutos.

### 3.2.- Experimentación con extractos de maca

La Hemólisis fue inducida por AAPH en función del tiempo de incubación en relación con la concentración del extracto de maca ya sea acuoso, etanólico o clorofórmico. La mezcla consistirá en una suspensión al 20% de eritrocitos en 10mM de buffer salino fosfato (pH = 7.4) con 74mM AAPH. Al cual se le añadió diferentes concentraciones de extractos. Cada reacción fue llevada afuera después de una preincubación a 37°C con agitación suave. Luego centrifugada y leída a 540 nm en el espectrofotómetro.



**Figura 26.** Soluciones acuosas de maca

Las soluciones de maca se prepararon como sigue: Se peso aproximadamente 100mg de los extractos secos (etanólicos y cloroformicos); de los extractos acuosos se agregaron directamente ya que se encontraban en solución (**Figura 26**). Las concentraciones que se obtuvieron oscilaban entre 7.5 y 120mg/L. Posteriormente se preparó los sistemas en la forma que sigue: para un volumen total de 6 mL, las proporciones se muestran en el **Cuadro 6**.

**Cuadro 6.** Ensayo de la hemólisis

Sol. AAPH (mL)	Buffer (mL)	Suspensión 20% de Eritrocitos (mL)	Extracto de maca (mL)	Concentración aproximada (mg/L)
2.2	1.925	1.8	0.075	7.5 ± 1.20
2.2	1.850	1.8	0.150	15 ± 2.99
2.2	1.700	1.8	0.300	30 ± 4.40
2.2	1.400	1.8	0.600	60 ± 8.60
2.2	0.800	1.8	1.200	120 ± 17.80

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.- Ensayo con vitamina E

Se utilizó el método de solubilización por co-precipitación con povidona para hacer que la vitamina E (EPHYNAL) sea soluble en medios acuosos. Primeramente se tomó 100 mg de aceite de alfa-tocoferol y se disolvió en 10ml de cloroformo, luego se solubilizó con 4g de povidona (1:40), y se evaporó el solvente a temperatura ambiente por 72 horas, una vez obtenido un polvo se enrasó en una fiola de 25mL y se realizó el ensayo de hemólisis, el cual consistió en una suspensión al 20 % de eritrocitos en 10mM de buffer salino fosfato (pH=7.4) con 74mM AAPH. La concentración final de tocoferol será de 10mg/L (23.2  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>51</sup> incubar a 37°C, agitar ligeramente, centrifugar y realizar la lectura en el Espectrofotómetro.

### 3.4.- Ensayo con vitamina C

El método utilizado fue similar al de la vitamina E sólo que en este caso la vitamina C es soluble en medios acuosos, porque no se solubilizó con povidona. Se disolvió el ácido ascórbico hasta obtener una concentración final de 1761mg/L (10mM).<sup>53</sup> Se incubó a 37°C, agitó ligeramente, centrifugó y finalmente se realizó la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro.

#### 4.- ANALISIS ESTADISTICO

El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó en los programas SSPS para Windows versión 11.0 y MICROSOFT EXCEL 2000



**CAPITULO III**

**RESULTADOS Y**

**DISCUSION**

La generación de hemólisis por medio de un compuesto iniciador de radicales libres como es el AAPH ha sido estudiado detalladamente por Miki *et al* (1987) y Sato *et al*, (1995) los cuales demostraron que al administrar AAPH a una solución acuosa y a 37 °C producía hemólisis la cual era cuantificada por liberación de hemoglobina, esta última era cuantificada espectrofotométricamente, ellos demostraron que aparte de la hemólisis se producía *peroxidación* lipídica y la oxidación de proteínas pertenecientes a la membrana plasmática del eritrocito.

Una vez obtenida la curva de la evolución de la hemólisis inducida por AAPH la cual se muestra en los **Gráficos 1 y 2** en las cuales se aprecia que la producción de hemólisis es directamente proporcional a la concentración de AAPH, mismos resultados obtuvieron Sato *et al* (1995) y Miki *et al* (1987), ellos recomendaron trabajar con la concentración de 74 mM de AAPH la cual se tomó como control para realizar la experimentación.

En el **Gráfico 1** se muestra la evolución de la hemólisis (%) inducida por AAPH vs. Tiempo, se aprecia claramente que la concentración de 74 mM produce mayor y uniforme hemólisis. En el **Grafico 2** se muestra también el porcentaje de hemólisis, aquí se aprecia más claramente la tendencia de la hemólisis, teniendo en cuenta la concentración y el tiempo.

GRAFICO 1

Inducción de hemolisis por AAPH a diferentes concentraciones

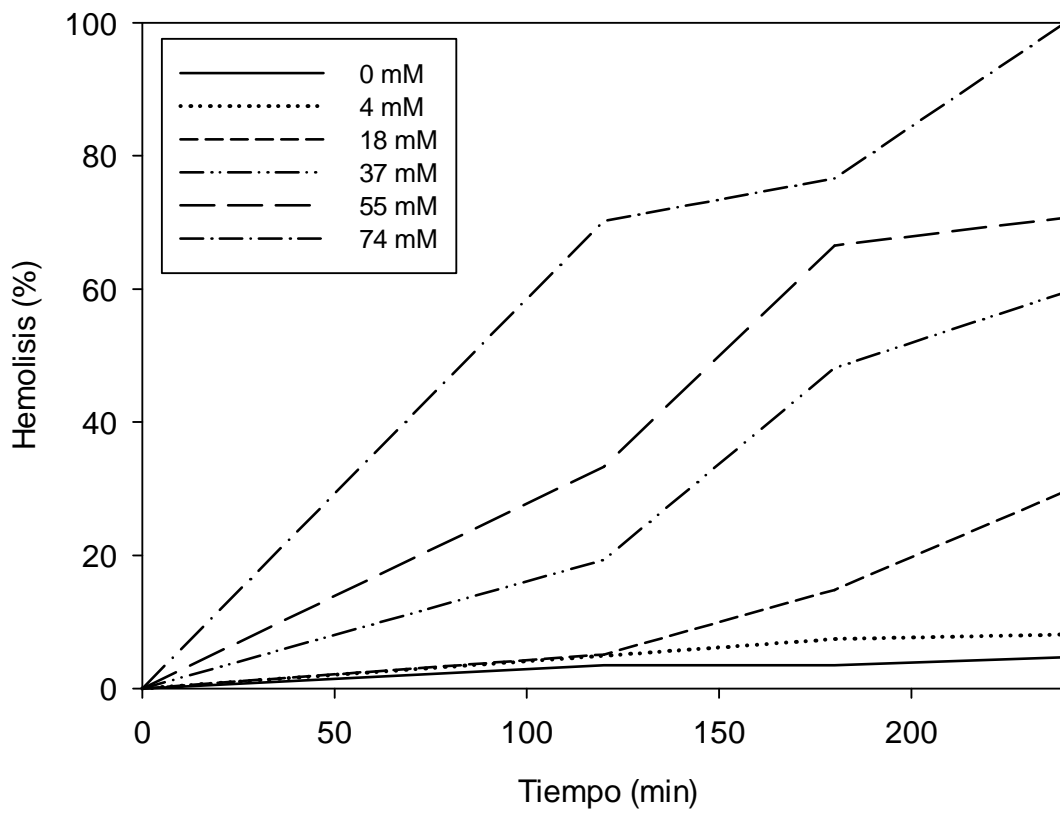
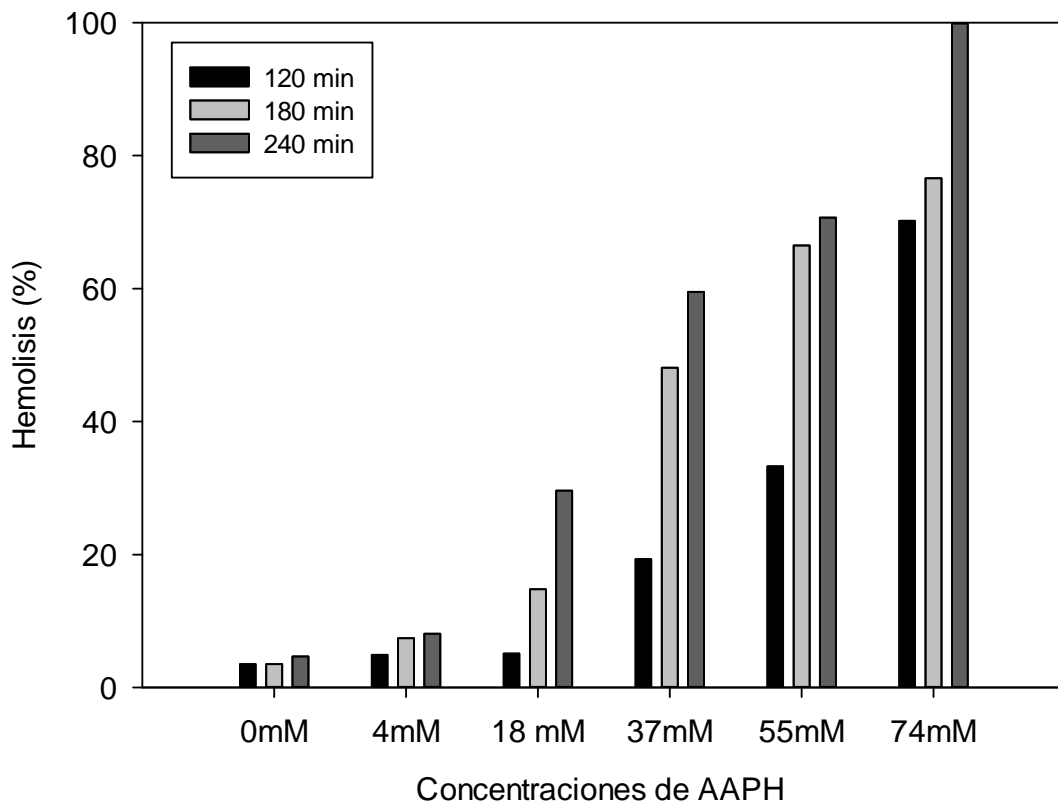


GRAFICO 2.

Tendencia de la hemólisis inducida por AAPH



Como se aprecia en la **Tabla 7**, se muestran las absorbancias obtenidas para la hemólisis inducida por AAPH a diferentes concentraciones y a intervalos de tiempo de 120, 180 y 240 minutos, estos tiempos se escogieron ya que las absorbancias a tiempos menores no eran significativas. Se puede apreciar que el valor máximo es de 0,856 el cual se tomó como absorbancia B (100% de hemólisis), para calcular los valores de porcentaje de hemólisis, los cuales se pueden apreciar en la **Tabla 7-A**.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 7. Absorbancias de Hemólisis Inducida por AAPH en relación al tiempo de incubación

AAPH (mM)	Tiempo (min)		
	120	180	240
0	0.030	0.030	0.040
4	0.042	0.063	0.069
18	0.043	0.127	0.253
37	0.165	0.411	0.569
55	0.285	0.569	0.601
74	0.601	0.656	0.856

**Fuente:** Elaboración propia.

Tabla 7-A. Porcentajes de Hemólisis Inducida por AAPH en relación al tiempo de incubación

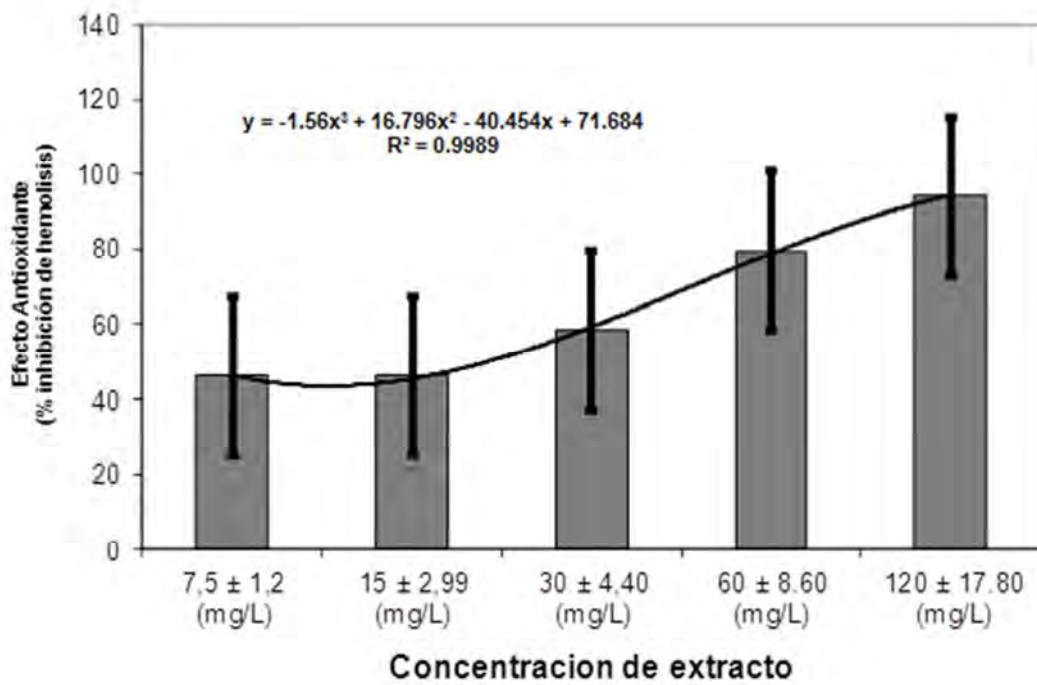
AAPH (mM)	Tiempo (min)		
	120	180	240
0	3.5	3.5	4.7
4	4.9	7.4	8.1
18	5.1	14.8	29.6
37	19.3	48.1	59.5
55	33.3	66.5	70.7
74	70.2	76.6	100.0

**Fuente:** Elaboración propia.

En los **Gráficos del 3-6** se puede apreciar el efecto antioxidante para cada extracto acuoso en un diagrama de barras con sus respectivas tablas de absorbancias (**Tablas 8-A, 9-A, 10-A y 11-A**), así también como el efecto antioxidante expresado como inhibición de hemólisis para cada extracto (**Tablas 8-B, 9-B, 10-B y 11-B**) se aprecia también para cada gráfico su ecuación de tendencia respectiva.

GRAFICO 3

Efecto antioxidante del extracto acuoso de harina cruda de maca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 8-A. Absorbancias de las muestras

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.470	0.402	0.210	0.051	0.015
180	0.468	0.525	0.353	0.202	0.053
240	0.441	0.456	0.506	0.275	0.82

**Fuente:** Elaboración Propia.

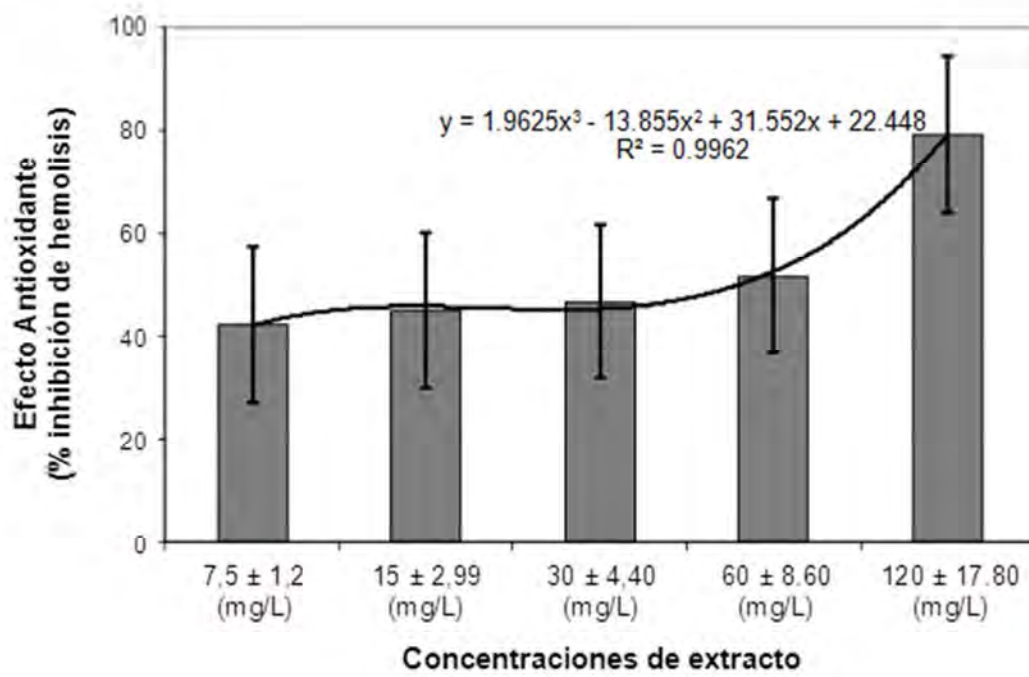
Tabla 8-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	45,09	53,04	75,47	94,04	98,25
180	45,33	38,67	58,76	76,40	93,81
240	48,48	46,73	40,89	67,87	90,42

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 4

Efecto antioxidante del extracto acuoso de harina tostada de maca.



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 9-A. Absorbancias de las muestras

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.424	0.413	0.353	0.263	0.057
180	0.508	0.453	0.447	0.450	0.217
240	0.549	0.548	0.568	0.528	0.258

**Fuente:** Elaboración Propia.

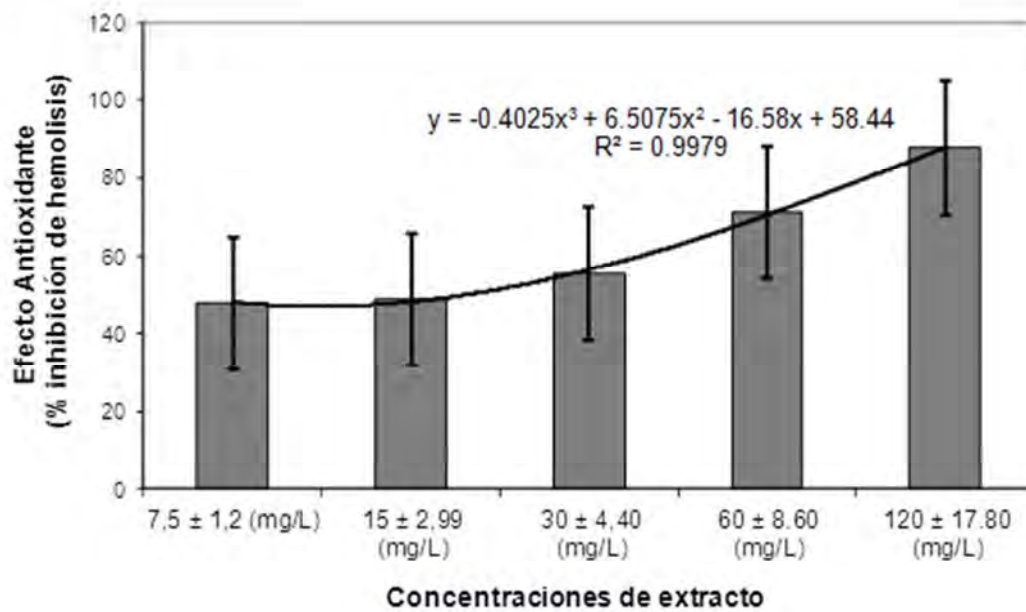
Tabla 9-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	50,47	51,75	58,76	69,28	93,34
180	40,65	47,08	47,78	47,43	74,65
240	35,86	35,98	33,64	38,32	70,09

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 5

Efecto antioxidante del extracto acuoso del ecotipo amarilla.



## RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 10-A. Absorbancias de las muestras

<b>Tiempo (min)</b>	<b>7.5 ± 1.20 mg/L</b>	<b>15 ± 2.99 mg/L</b>	<b>30 ± 4.40 mg/L</b>	<b>60 ± 8.60 mg/L</b>	<b>120 ± 17.80 mg/L</b>
120	0.431	0.328	0.322	0.196	0.046
180	0.484	0.518	0.365	0.238	0.127
240	0.426	0.468	0.461	0.305	0.142

**Fuente:** Elaboración Propia.

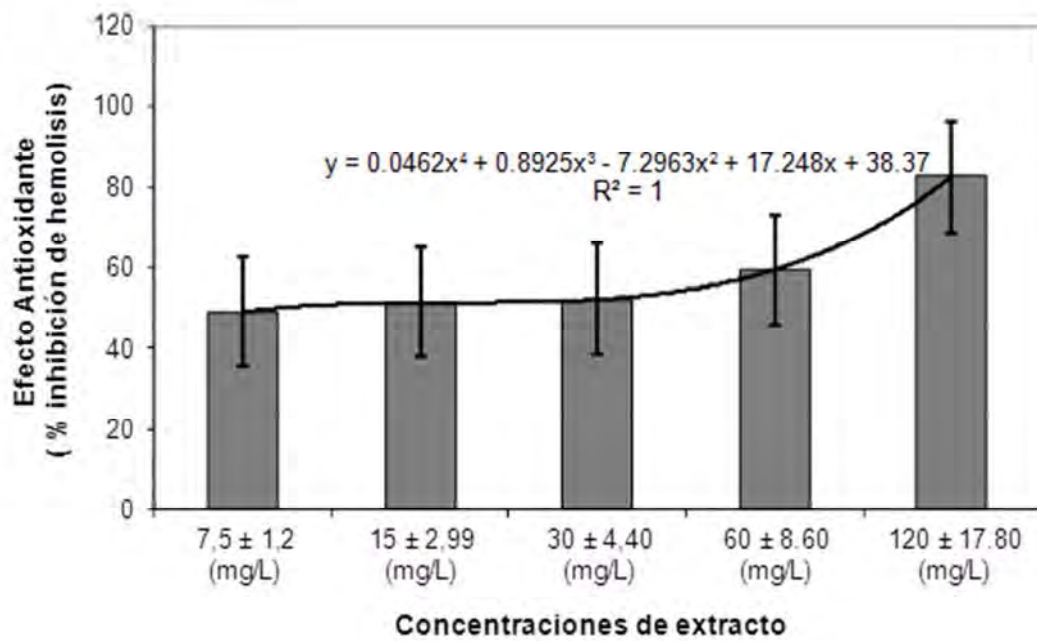
Tabla 10-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

<b>Tiempo (min)</b>	<b>7.5 ± 1.20 mg/L</b>	<b>15 ± 2.99 mg/L</b>	<b>30 ± 4.40 mg/L</b>	<b>60 ± 8.60 mg/L</b>	<b>120 ± 17.80 mg/L</b>
120	49,65	61,68	62,38	77,10	94,63
180	43,46	39,49	57,36	72,20	85,16
240	50,23	45,33	46,14	64,37	83,41

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 6

Efecto antioxidante del extracto acuoso del ecotipo blanca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 11-A. Absorbancias de las muestras

<b>Tiempo (min)</b>	<b>7.5 ± 1.20 mg/L</b>	<b>15 ± 2.99 mg/L</b>	<b>30 ± 4.40 mg/L</b>	<b>60 ± 8.60 mg/L</b>	<b>120 ± 17.80 mg/L</b>
120	0.393	0.254	0.434	0.431	0.041
180	0.500	0.511	0.376	0.273	0.201
240	0.410	0.479	0.415	0.334	0.203

**Fuente:** Elaboración Propia.

Tabla 11-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

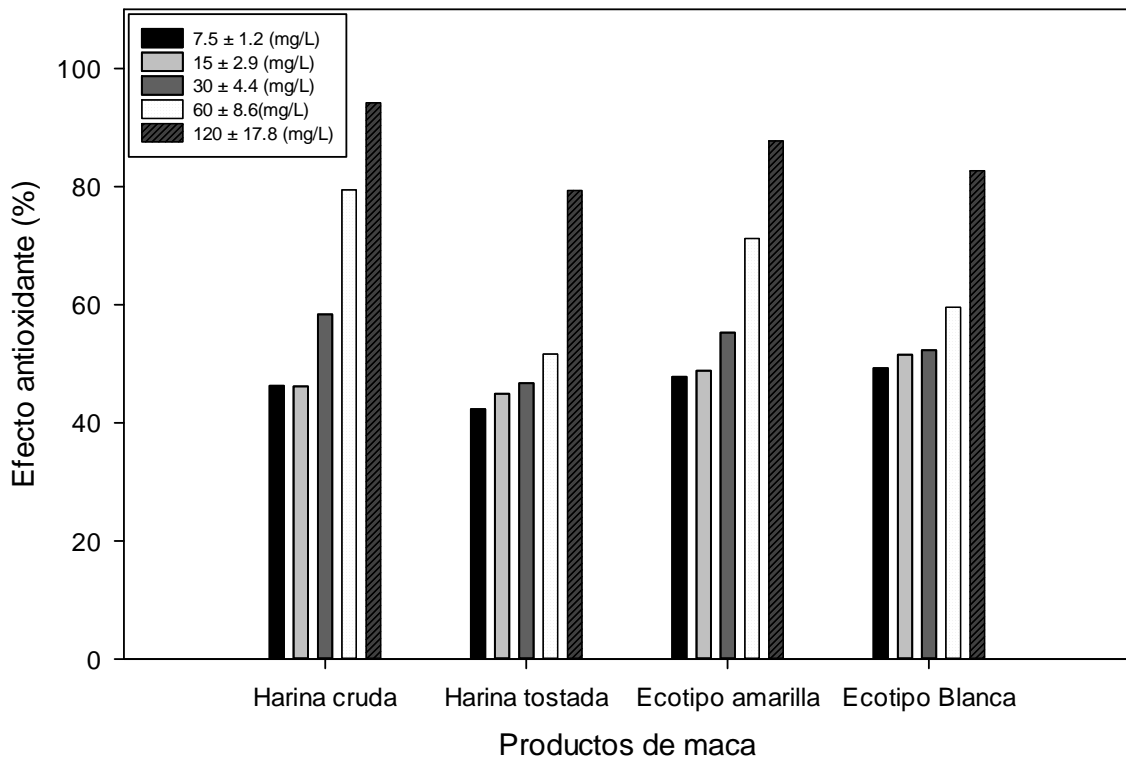
<b>Tiempo (min)</b>	<b>7.5 ± 1.20 mg/L</b>	<b>15 ± 2.99 mg/L</b>	<b>30 ± 4.40 mg/L</b>	<b>60 ± 8.60 mg/L</b>	<b>120 ± 17.80 mg/L</b>
120	54,09	70,33	49,30	49,65	95,21
180	41,59	40,30	56,07	68,11	76,52
240	52,10	44,04	51,52	60,98	76,29

**Fuente:** Elaboración Propia.

En el **Gráfico 7** se resume los efectos antioxidantes expresados en porcentaje de inhibición de hemólisis. Se puede apreciar que los mejores resultados aparentemente son los de la harina de maca cruda, lo cual podría hacer suponer que por ser una mezcla de varios ecotipos, contendría también una mezcla de compuestos existentes en un ecotipo en mayor cantidad que en otro. Un posible responsable sería los compuestos glucocinolatos y flavonoides ya que han sido reportados en extractos acuosos.

GRAFICO 7

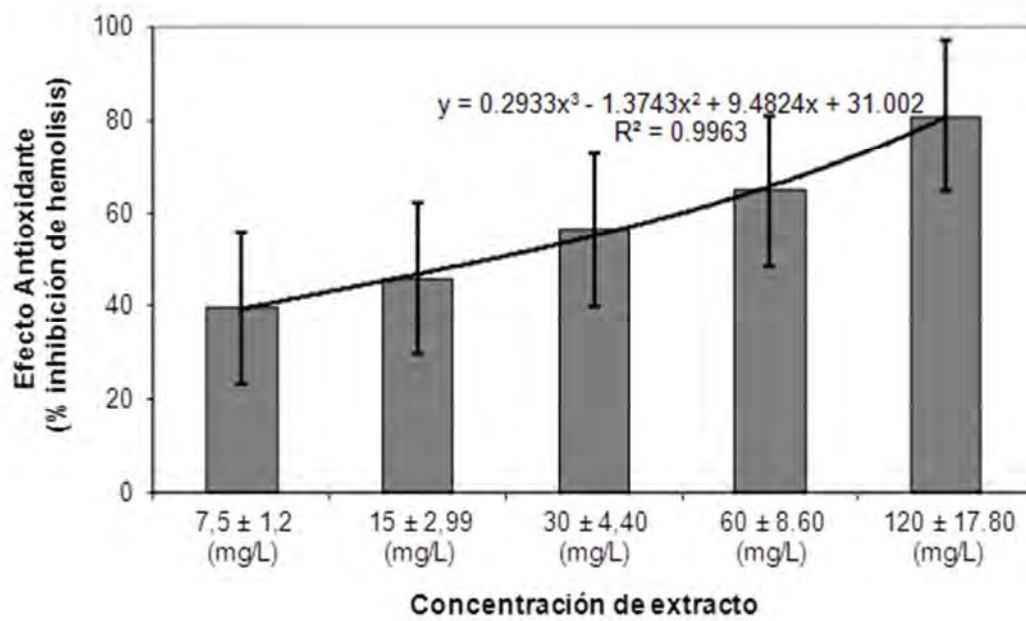
Porcentaje de inhibición de la hemolisis por AAPH de los extractos acuosos



En los **Gráficos 8-11** se puede apreciar el efecto antioxidante para cada extracto acuoso en un diagrama de barras con sus respectivas tablas de absorbancias (**Tablas 12-A, 13-A, 14-A y 15-A**), así también como el efecto antioxidante expresado como inhibición de hemólisis para cada extracto (**Tablas 12-B, 13-B, 14-B y 15-B**). Se aprecia también para cada gráfico su ecuación de tendencia respectiva.

GRAFICO 8

Efecto antioxidante del extracto etanólico de la harina cruda de maca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 12-A. Absorbancias de las muestras.

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.340	0.186	0.186	0.100	0.059
180	0.354	0.348	0.249	0.138	0.069
240	1.094	1.179	0.684	0.664	0.361

**Fuente:** Elaboración Propia.

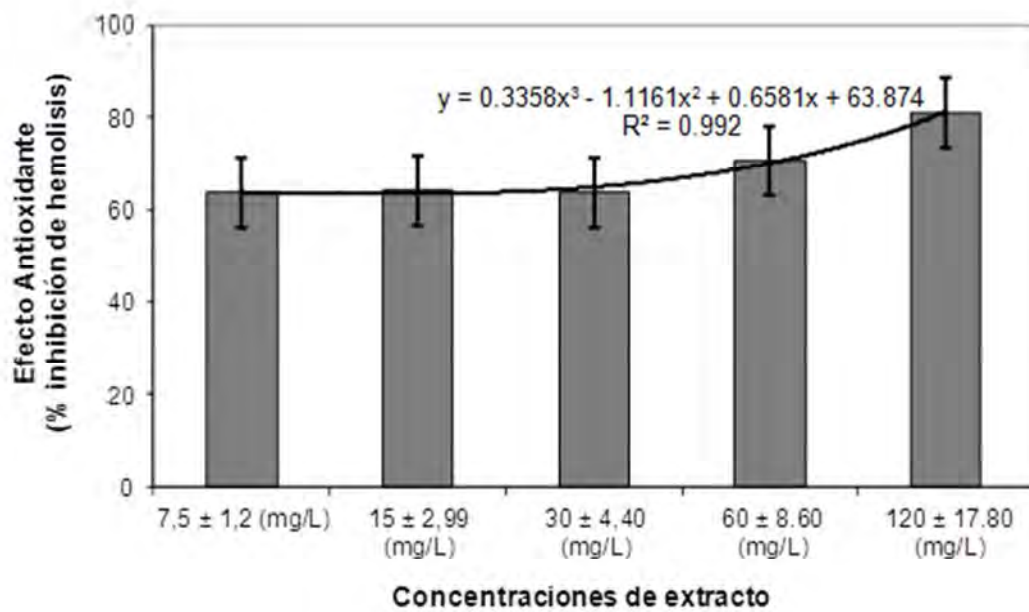
Tabla 12-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	60.28	78.27	78.27	88.32	93.11
180	58.64	59.35	70.91	83.88	91.94
240	0.00	0.00	20.09	22.43	57.83

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 9

Efecto antioxidante del extracto etanólico de harina tostada de maca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 13-A. Absorbancias de las muestras.

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.079	0.075	0.085	0.065	0.052
180	0.449	0.449	0.398	0.319	0.178
240	0.407	0.399	0.444	0.366	0.258

**Fuente:** Elaboración Propia.

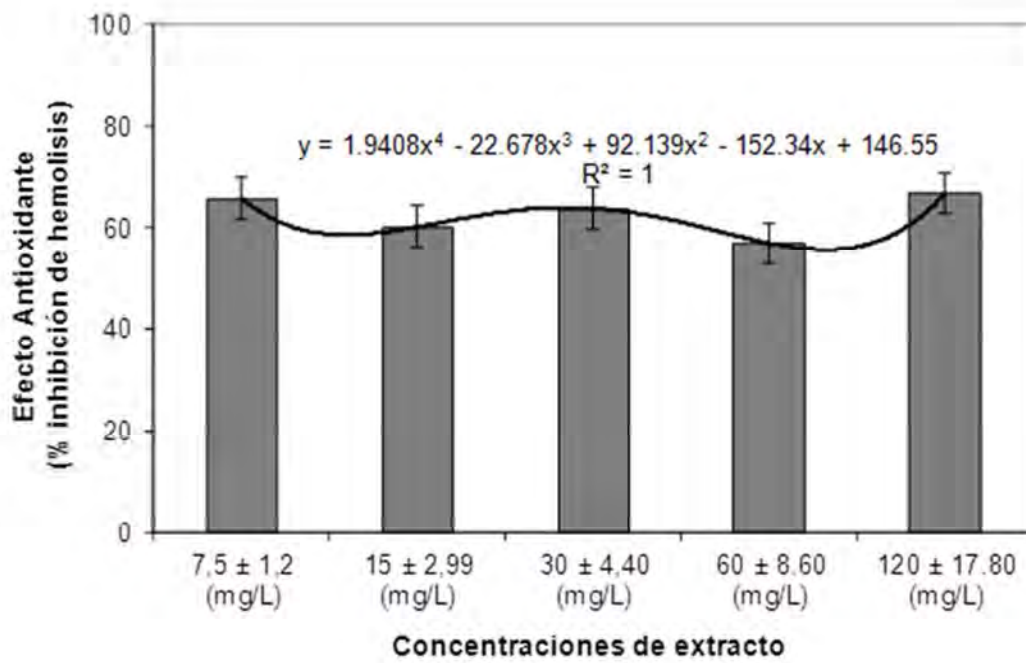
Tabla 13-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	90.77	91.24	90.07	92.41	93.93
180	47.55	47.55	53.50	62.73	79.21
240	52.45	53.39	48.13	57.24	70.09

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 10

Efecto antioxidante del extracto etanólico del ecotipo amarilla



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 14-A. Absorbancias de las muestras.

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.209	0.192	0.181	0.166	0.040
180	0.315	0.472	0.403	0.541	0.431
240	0.359	0.362	0.349	0.401	0.388

**Fuente:** Elaboración Propia.

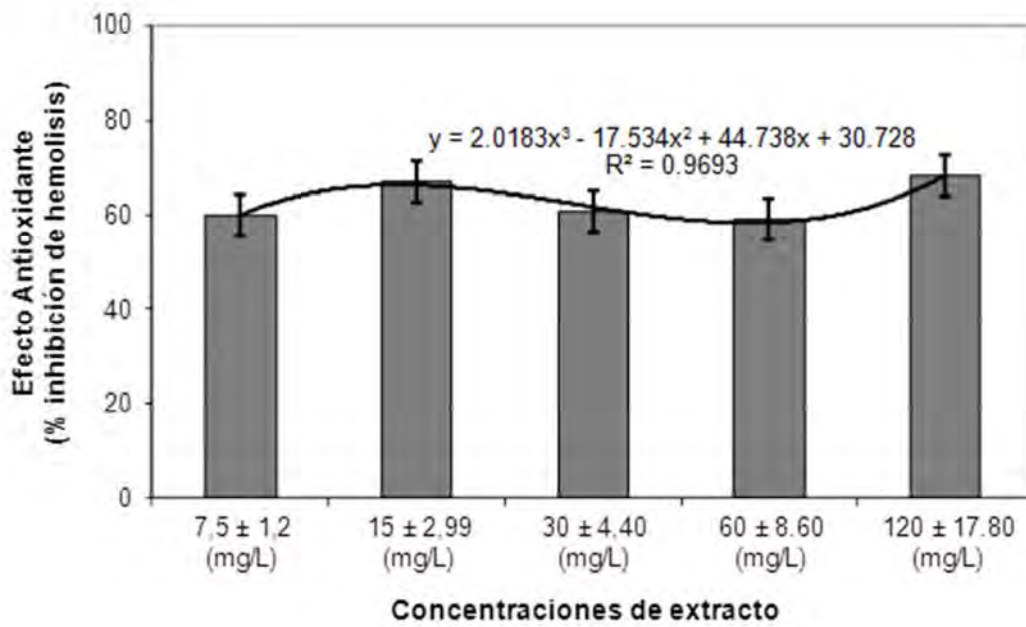
Tabla 14-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	75.58	77.57	75.86	80.61	95.33
180	63.20	44.86	52.92	36.80	49.65
240	58.06	57.71	59.23	53.15	54.67

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 11

Efecto antioxidante del extracto etanólico del ecotipo blanca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 15-A. Absorbancias de las muestras

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.261	0.205	0.231	0.208	0.123
180	0.438	0.363	0.452	0.480	0.389
240	0.334	0.281	0.330	0.364	0.305

**Fuente:** Elaboración Propia.

Tabla 15-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

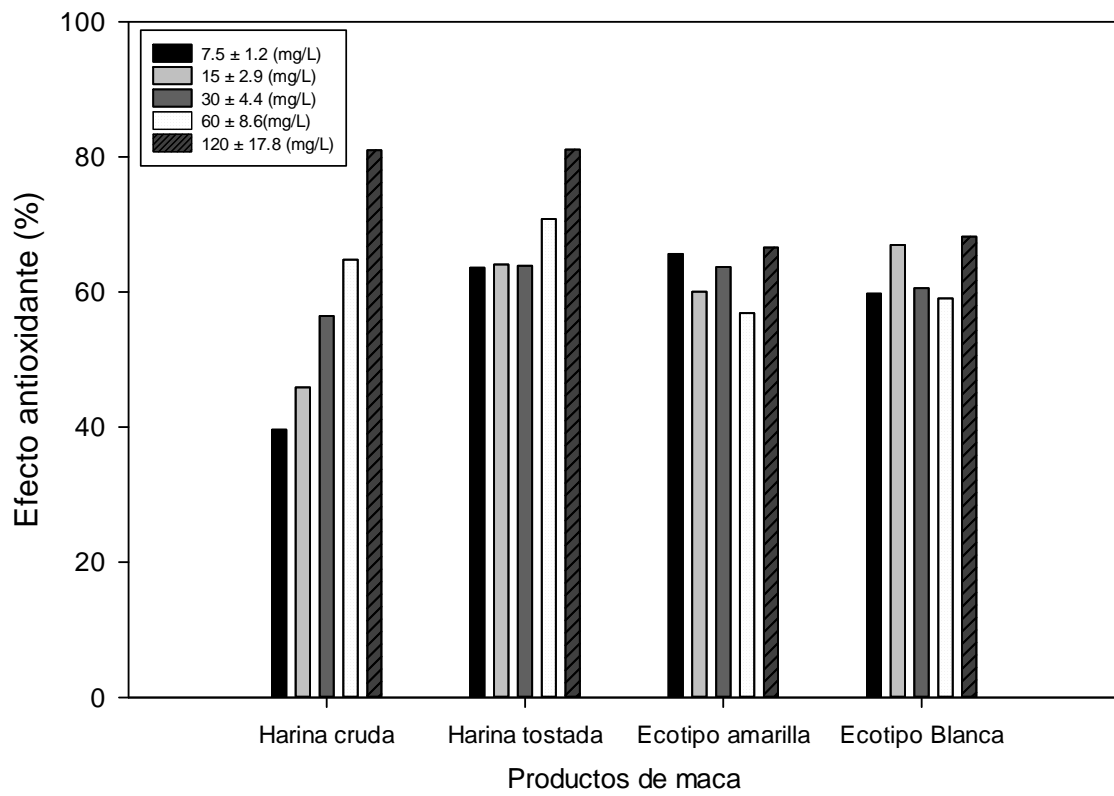
Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	69.51	76.05	73.01	75.70	85.63
180	48.83	57.59	47.20	43.93	54.56
240	60.08	67.17	61.45	57.48	64.37

**Fuente:** Elaboración Propia.

En el **Gráfico 12** se resume los efectos antioxidantes de los diferentes extractos etanólicos. Se puede apreciar que los mejores resultados aparentemente son los de la harina de maca cruda, al igual que para los extractos acuosos lo cual podría hacer suponer que los compuestos responsables de la actividad antioxidante serían tanto solubles en agua como también en etanol, pero tanto como en esta comparación como para los extractos acuosos se aprecia que los dos mejores resultados son para la harina tanto cruda como tostada. Por otro lado, los extractos de ecotipos puros presentaron también efecto antioxidante pero notablemente en menor intensidad que para las harinas, dando una idea para creer que la mezcla de ecotipos sería una mejor forma de administración de maca y en la cual se encontrarían más concentrados los principios activos.

GRAFICO 12

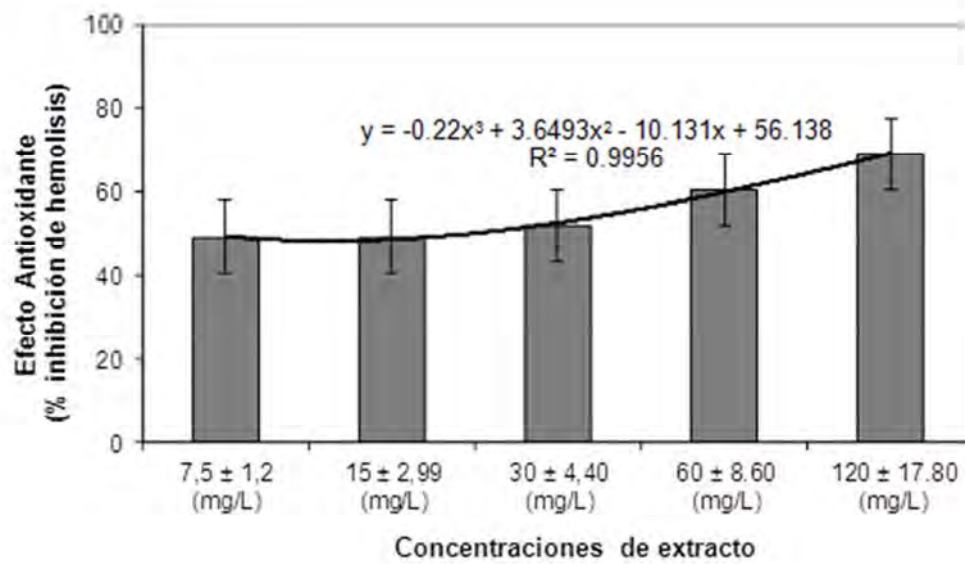
Porcentaje de inhibición de la hemolisis por AAPH de los extractos etanólicos.



En los **Gráficos 13-16** se puede apreciar el efecto antioxidante para cada extracto acuoso en un diagrama de barras con sus respectivas tablas de absorbancias (**Tablas 16-A, 17-A, 18-A y 19-A**) así también como el efecto antioxidante expresado como inhibición de hemólisis para cada extracto (**Tablas 16-B, 17-B, 18-B y 19-B**). Se aprecia también para cada gráfico su ecuación de tendencia respectiva.

GRAFICO 13

Efecto antioxidante del extracto cloroformico de harina druda de maca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 16-A. Absorbancias de las muestras

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.065	0.116	0.043	0.076	0.059
180	0.765	0.755	0.759	0.517	0.369
240	0.472	0.432	0.435	0.422	0.366

**Fuente:** Elaboración Propia.

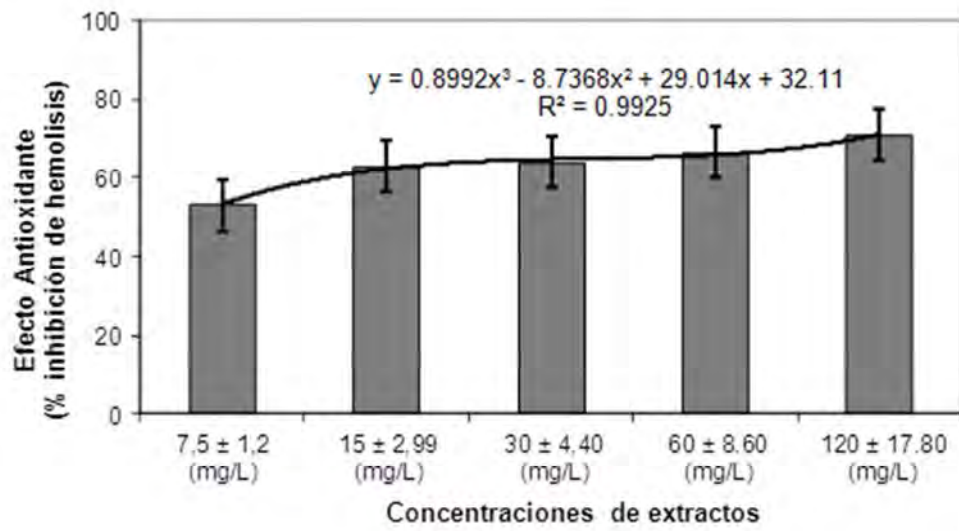
Tabla 16-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	92.41	86.45	94.98	91.12	93.11
180	10.63	11.80	11.33	39.60	56.89
240	44.88	49.53	49.18	50.70	57.24

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 14

Efecto antioxidante del extracto cloroformico de harina tostada de maca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 17-A. Absorbancias de muestras.

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.260	0.249	0.220	0.207	0.252
180	0.401	0.301	0.348	0.349	0.490
240	0.542	0.402	0.357	0.305	0.379

**Fuente:** Elaboración Propia.

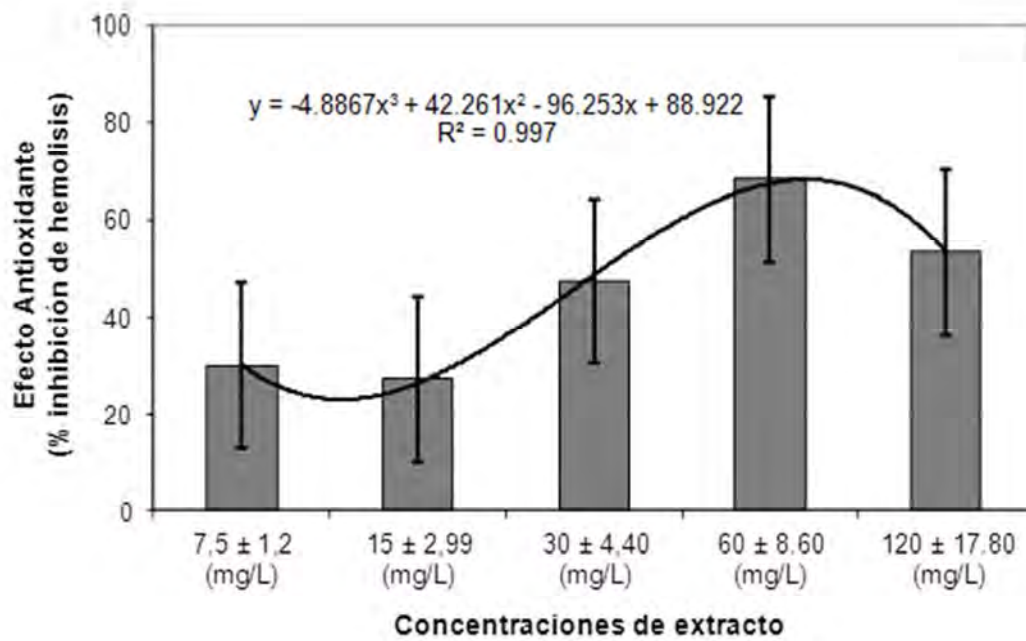
Tabla 17-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	69.63	70.91	74.30	75.82	70.56
180	53.15	64.84	59.35	59.23	42.76
240	36.68	53.04	58.29	64.37	55.72

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 15

Efecto antioxidante del extracto cloroformico del ecotipo amarilla



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 18-A. Absorbancias de las muestras.

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.065	0.116	0.043	0.076	0.059
180	0.765	0.755	0.759	0.517	0.369
240	0.472	0.432	0.435	0.422	0.366

**Fuente:** Elaboración Propia.

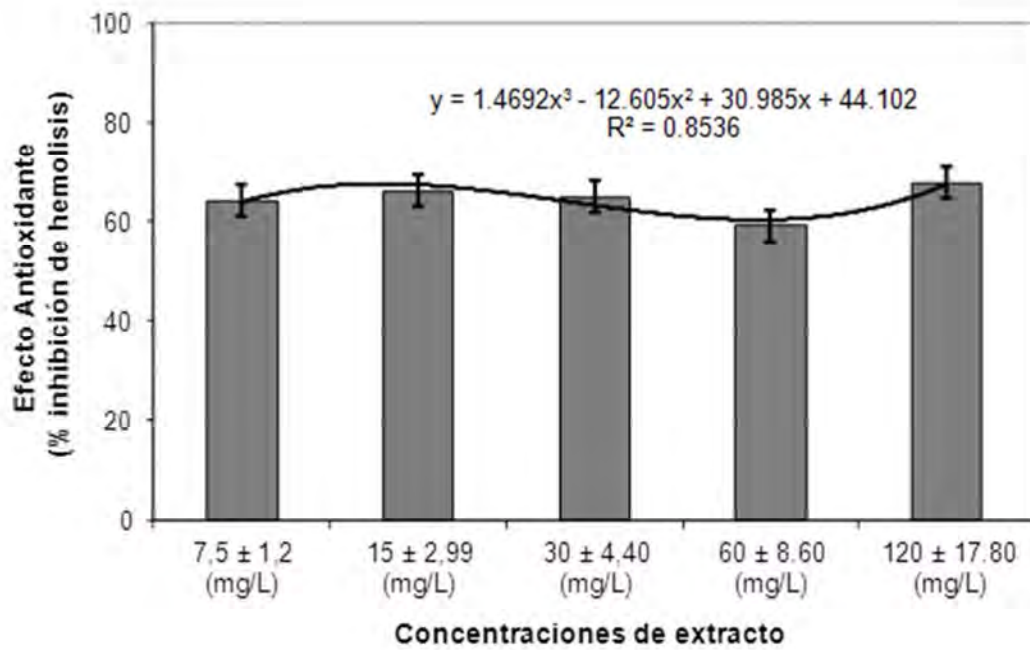
Tabla 18-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	87.70	87.03	94.86	76.52	72.55
180	1.75	46.14	45.91	84.93	92.99
240	0.00	0.00	0.93	55.72	61.57

**Fuente:** Elaboración Propia.

GRAFICO 16

Efecto antioxidante del extracto cloroformico del ecotipo blanca



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 19-A. Absorbancias de las muestras.

Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	0.195	0.109	0.201	0.244	0.156
180	0.325	0.212	0.395	0.409	0.361
240	0.398	0.187	0.301	0.395	0.309

**Fuente:** Elaboración Propia.

Tabla 19-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

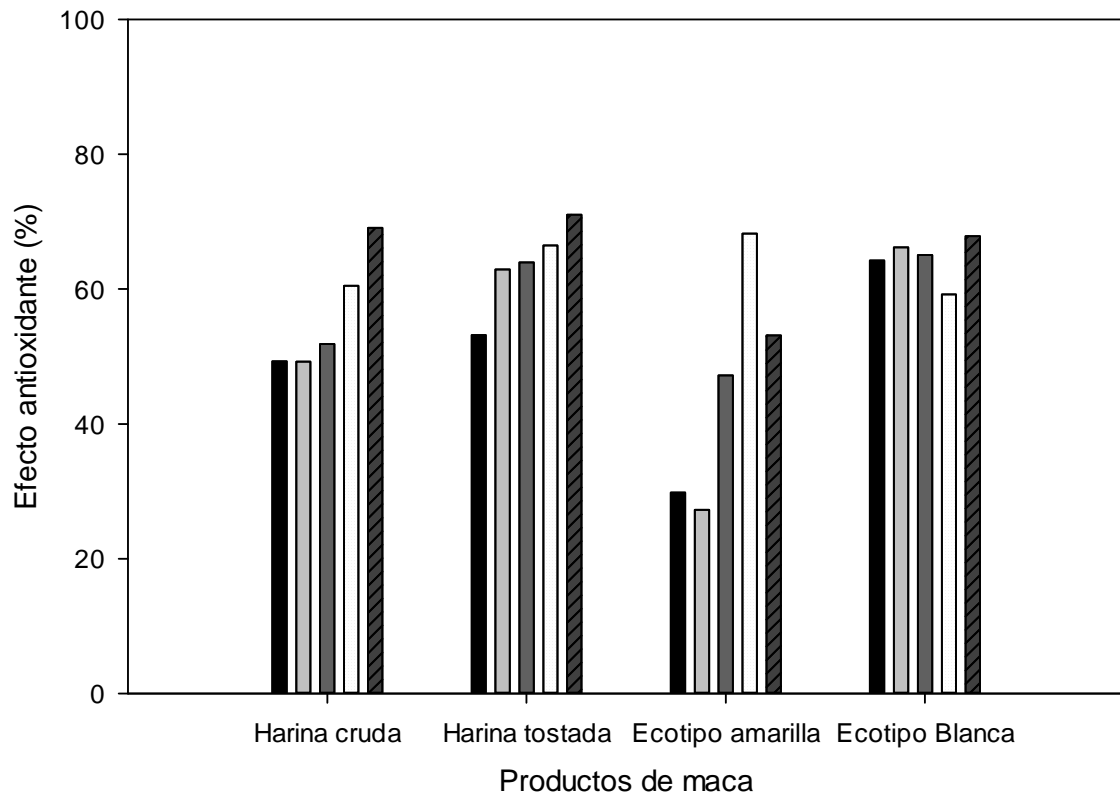
Tiempo (min)	7.5 ± 1.20 mg/L	15 ± 2.99 mg/L	30 ± 4.40 mg/L	60 ± 8.60 mg/L	120 ± 17.80 mg/L
120	77.22	87.27	76.52	71.50	81.78
180	62.03	75.23	53.86	52.22	57.83
240	53.50	78.15	64.84	53.86	63.90

**Fuente:** Elaboración Propia.

En el **Gráfico 17** se resume los efectos de los extractos clorofórmicos. Se aprecia la diferencia con los dos extractos anteriores (acuoso y etanólico), la harina tostada posee mayor efecto antioxidante aparentemente, seguido de la harina cruda, el ecotipo amarillo y finalmente el ecotipo blanco. Nuevamente pensamos que la mezcla de varios ecotipos posee mejor efecto antioxidante que los extractos de ecotipos puros.

GRAFICO 17

Porcentaje de inhibición de la hemolisis por AAPH de los extractos cloroformicos



Ahora si comparamos dos antioxidantes muy bien conocidos como son la vitamina E y la vitamina C, apreciamos al compararlos que ambos poseen notable efecto antioxidante (**Gráficos 18 y 19**). Si se toman los mejores resultados de cada extracto y se comparan con cada antioxidante (**Gráficos 20 y 21**) observamos, según el tamaño de las barras, que el efecto antioxidante del extracto acuoso y etanólico de harina cruda de maca posee aparentemente mayor efecto que la vitamina E y que el extracto clorofórmico de harina tostada (**Gráfico 20**).

GRAFICO 18

Efecto antioxidante de la vitamina C y vitamina E

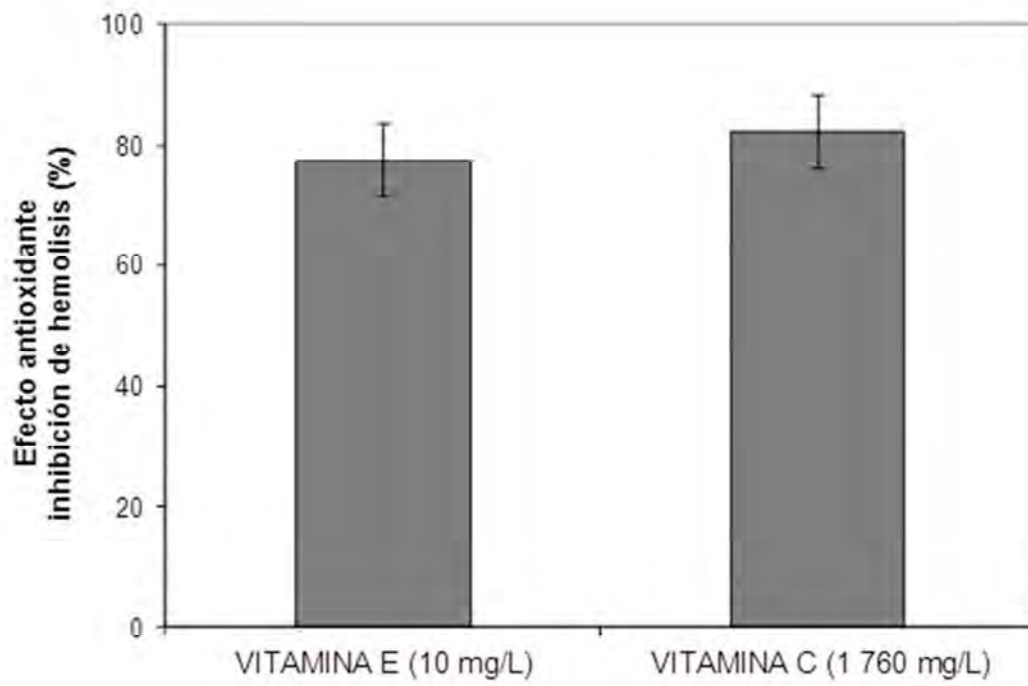


GRAFICO 19

Disminución de la hemolisis inducida por AAPH por la vitamina E y vitamina C

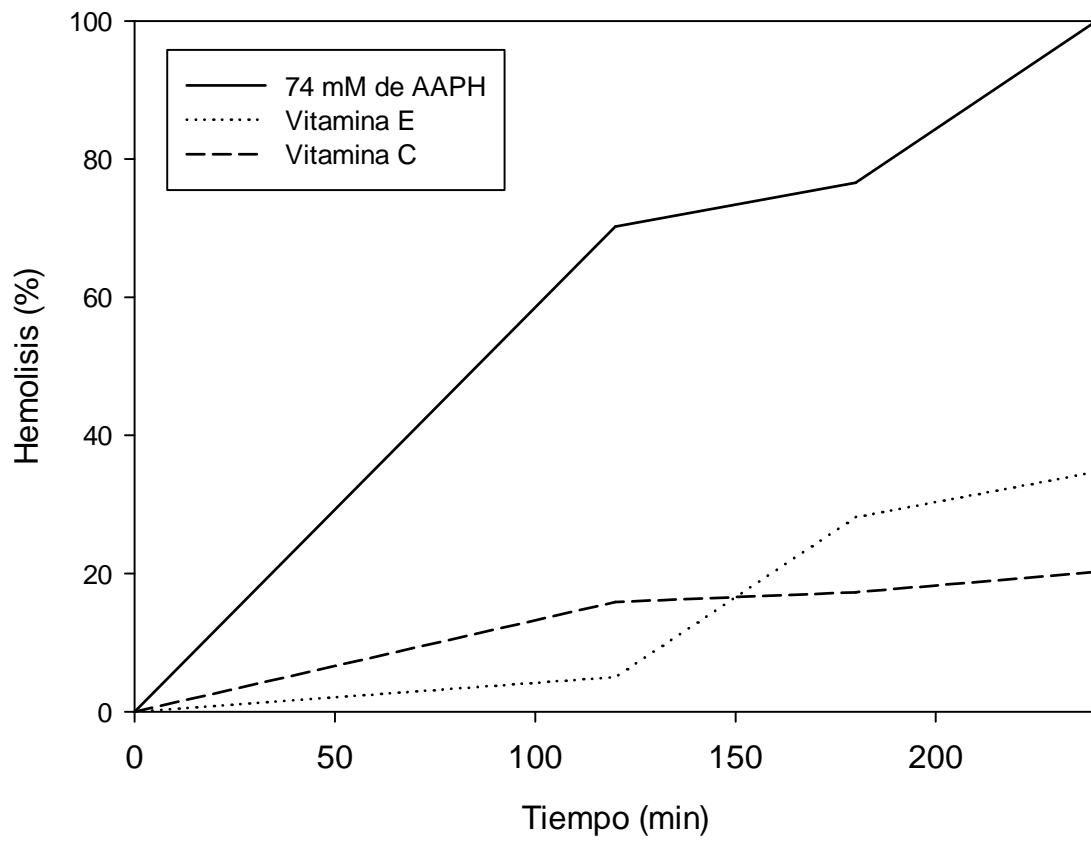


Tabla 20-A. Absorbancias de las muestras.

Tiempo (min)	VITAMINA E ( 10 mg/L)	VITAMINA C (1 760 mg/L)
120	0.043	0.136
180	0.241	0.137
240	0.297	0.173

**Fuente:** Elaboración propia.

Tabla 20-B. Efecto antioxidante (Inhibición de Hemólisis) (%)

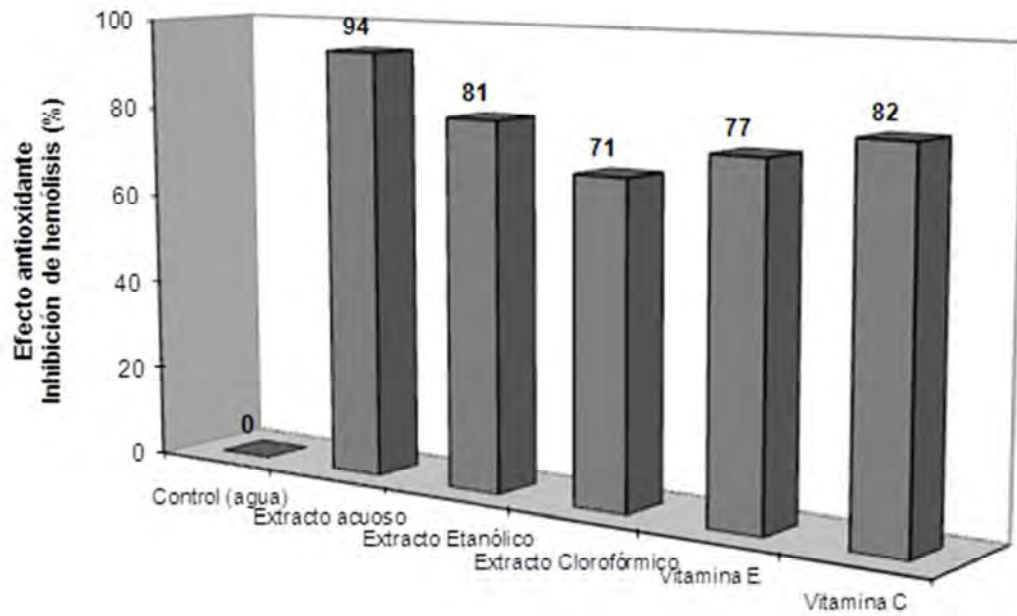
Tiempo (min)	VITAMINA E ( 10 mg/L)	VITAMINA C (1 760 mg/L)
120	94.98	84.12
180	71.85	82.71
240	65.31	79.79

**Fuente:** Elaboración propia.

En **Gráfico 20** se puede apreciar la comparación entre los mejores resultados para cada extracto comparados con el control (agua) y las Vitaminas E y C respectivamente, puede ver se que aparentemente el extracto acuoso de harina cruda de maca poseería mayor efecto antioxidante (94%) en comparación a la vitamina E y vitamina C (77% y 82% respectivamente), pero la estadística demostrará si existe diferencia en el efecto antioxidante.

GRAFICO 20

Efecto antioxidante de los extractos del *Lepidium peruvianum* chacón "maca" frente a la vitamina E y vitamina E



Es bien conocido que la maca contiene minerales, flavonoides, vitamina C, glucosinolatos y compuestos nitrogenados los cuales son solubles en agua, esto nos hace pensar que es muy probable que uno de estos sea el responsable del efecto antioxidante, pero si evaluamos los compuestos reportados solubles en solventes alcohólicos tenemos también a flavonoides, glucosinolatos y compuestos nitrogenados, así como también azúcares libres y aminoácidos entre otros. Notamos que los que se encuentran en ambos extractos son los glucosinolatos, flavonoides y compuestos nitrogenados. Es muy probable que algunos de estos sean responsables del efecto antioxidante y que el extracto acuoso contenga aparte de estos otros compuestos lo cual lo hace aparentemente más efectivo que el extracto etanólico.

Por otro lado, en el extracto clorofórmico (más hidrofóbico) se reportaron sustancias como esteroides, triterpenos, vitaminas liposolubles, carotenos benzil isotiocianato. Es notoria la diferencia de sustancias existentes para cada extracto. Una de las posibilidades era que los extractos contengan vitaminas liposolubles antioxidantes, pero se conoce que estas son muy inestables por lo que se descartaría esta premisa, quedándonos solamente posibles responsables como el benzil isotiocianato que ha sido reportado como antioxidante y terpenos además de muchos más.

Es muy probable que el efecto lo produzcan la macaina, macamidas o macaneos reportados en anteriores trabajos de investigación

## Análisis estadístico

Los resultados de efecto antioxidante fueron evaluados con la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) en el programa SPSS para Windows Versión 11, el resumen de la prueba se puede apreciar en el **Cuadro 7**. En este cuadro se puede apreciar la prueba para las diferentes concentraciones de cada extracto (acuoso, etanólico y clorofórmico). La prueba de Tukey reúne las muestras que tengan iguales características en grupos, es así que tenemos el grupo **a**, el cual corresponde al grupo control (agua), todos los que estén dentro de éste grupo tendrán igual efecto que el control, en otras palabras no tendrán efecto antioxidante alguno. Se puede apreciar también los grupos **b**, **c** y **d**. Todas las muestras que estén en estos grupos son diferentes del grupo control, es decir que poseen efecto antioxidante. Se observó que los que están en los grupos **c** y **d** son principalmente extractos acuosos a las concentraciones de  $60 \pm 8.6$  y  $120 \pm 17.8$  mg/L respectivamente, mientras que los que se encuentran en los grupos **b** son los extractos etanólicos, clorofórmicos y los extractos acuosos menores a las concentraciones mencionadas. Observamos en los extractos etanólicos y clorofórmicos de la harina cruda y el extracto clorofórmico del ecotipo amarilla solo poseen efecto antioxidante en concentraciones mayores a  $60 \pm 8.6$  mg/L, los demás extractos poseen efecto antioxidante en todas las concentraciones experimentadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuadro 7. Prueba de Tukey para el efecto antioxidante de los diferentes extractos del *Lepidium peruvianum* Chacón "Maca" ( $p = 0.05$ ).

Concentración (mg/L)	EXTRACTO ACUOSO				EXTRACTO ETANOLICO				EXTRACTO CLOROFORMICO			
	Harina cruda	Harina tostada	Ecotipo amarilla	Ecotipo blanca	Harina cruda	Harina tostada	Ecotipo amarilla	Ecotipo blanca	Harina cruda	Harina tostada	Ecotipo amarilla	Ecotipo blanca
Control	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
7,5 ± 1,20	b	b	b	b	a	b	b	b	a	b	a	b
15 ± 2,99	b	b	b	b	a	b	b	b	a	b	a	b
30 ± 4,40	b	b	b	b	a	b	b	b	a	b	a	b
60 ± 8,60	c	b	c	b	b	b	b	b	b	b	b	b
120 ± 17,80	d	c	d	c	b	b	b	b	b	b	b	b

Fuente: Elaboración propia.

En el **Cuadro 8** se muestra la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) aplicada a las concentraciones que presentaron mejor efecto antioxidante en comparación con dos antioxidantes conocidos como la vitamina E y vitamina C, se aprecia claramente dos grupos (**a** y **b**); el grupo **a** pertenece al grupo control (agua) y el grupo **b** los que poseen efecto antioxidante, es así que podemos afirmar que todos los extractos estudiados a las concentraciones de  $120 \pm 17.8$  mg/L tienen igual efecto antioxidante que la vitamina C y vitamina E

Cuadro 8. Prueba de Tukey en comparación con la vitamina E y vitamina C ( $p = 0.05$ ).

Antioxidante de Referencia	Tratamientos	N	Subconjuntos
<b>Vitamina E</b>	Control (agua)	3	<b>a</b>
	Vitamina E	3	<b>b</b>
	Extracto acuoso – Harina cruda (120 ± 17.8) mg/L	3	<b>b</b>
	Extracto etanólico – harina tostada (120 ± 17.8) mg/L	3	<b>b</b>
	Extracto clorofórmico – harina tostada (120 ± 17.8) mg/L	3	<b>b</b>
<b>Vitamina C</b>	Control (agua)	3	<b>a</b>
	Vitamina C	3	<b>b</b>
	Extracto acuoso – Harina cruda (120 ± 17.8) mg/L	3	<b>b</b>
	Extracto etanólico – harina tostada (120 ± 17.8) mg/L	3	<b>b</b>
	Extracto clorofórmico – harina tostada (120 ± 17.8) mg/L	3	<b>b</b>

**Fuente:** Elaboración propia.



# **CAPITULO IV**

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1.- Se comprobó el efecto antioxidante del *Lepidium peruvianum* Chacón in vitro, en eritrocitos

- ❖ Para el extracto acuoso los efectos antioxidante fueron para: la harina cruda con una efectividad promedio del 94,16% Para la harina tostada 79,36 %; para el ecotipo amarilla 87,73% y para el ecotipo blanca 82.67%. todas para la concentración de  $120 \pm 17,8$  mg/L.
  
- ❖ Para el extracto etanólico los efectos antioxidante fueron: para la harina cruda con una efectividad promedio del 80.96% Para la harina tostada 81.08 %; para el ecotipo amarilla 66.55% y para el ecotipo blanca 68.19%. todas para la concentración de  $120 \pm 17,8$  mg/L.
  
- ❖ Para el extracto clorofórmico los efectos antioxidantes fueron: para la harina cruda con una efectividad promedio del 69.08% Para la harina tostada 71,68 %; para el ecotipo amarilla 65,70% y para el ecotipo blanca 67,84%. todas para la concentración de  $120 \pm 17,8$  mg/L.

## CONCLUSIONES

2.- Las concentraciones en las cuales el *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) tuvo efecto altamente antioxidante fueron de  $60 \pm 8,6$ mg/L y  $120 \pm 17,8$  mg/L.

3.- Las presentaciones del *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) que mayor efecto antioxidante presentaron fueron:

- ❖ Harina cruda de maca: Extracto acuoso.
- ❖ Harina tostada de maca: Extracto etanólico.
- ❖ Ecotipo amarilla: Extracto acuoso.
- ❖ Ecotipo blanca: Extracto acuoso.

4.- Para cada extracto de *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) los mejores resultados para efecto antioxidante fueron los siguientes:

- ❖ Extracto acuoso: Harina de cruda de maca a  $120 \pm 17,8$  mg/L
- ❖ Extracto etanólico: Harina tostada maca  $120 \pm 17,8$  mg/L
- ❖ Extracto cloroformico: Harina tostada de maca  $120 \pm 17,8$  mg/L



# **SUGERENCIAS**

## SUGERENCIAS

- Ampliar el trabajo tomando todos los ecotipos posibles del *Lepidium peruvianum* Chacón (maca)
- Investigar otras propiedades las cuales puedan tener el *Lepidium peruvianum* Chacón (maca)
- Realizar otras investigaciones para determinar los posibles principios o complejos activos de los diferentes extractos del *Lepidium peruvianum* Chacón (maca)
- Determinar una posible formulación farmacéutica para los extractos y realizar estudios de estabilidad para los diferentes extractos.



# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Obregón Vilches, Lida. "**Maca**" *Planta Medicinal y Nutritiva del Perú*. Edit. Instituto de Fitoterapia Americana. 1997.
2. Yllesca Gutierrez, María. *Estudio Fitoquímico y comparativo de tres ecotipos de **Lepidium meyenii Walp** "Maca" procedente de Carhuamayo (Junín)*. Catedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1994. (pag.103).
3. Ciega de León, Pedro. *La Crónica del Perú*. Ediciones PEISA. Lima-Perú. 1973.
4. Rutsworoski de Diez Canseco, María. *Historia del Tahuantinsuyo*. 1992. (pág.332).
5. Weddell, H. A. *Plantas Inéditas de los Andes **Lepidium gelidium Wedd.*** Ann. Sci. Nat. 1984.
6. Ganzera M, Zhao J., Mamad I, Khan IA. *Chemical profiling and standardization of **Lepidium meyeii (maca)** by reversed phase high performance liquid chromatography*. Chem. Pharm. 50(7) 988 –911 (2002).
7. Beltrán S. Hamilton; Baldón M. Severo; Carrillo F. Elida; Fuertes R. Cesar; Arroyo A. Jorge; Sandoval M. Soledad; Obregón V. Lida, *Estudio Botánico y Químico de los Ecotipos amarillo y morado del **Lepidium peruvianum Maca**. Evaluación de su toxicidad aguda*. Universidad Mayor de San Marcos. 1997.
8. Muhammad I, Zhao J, Chuck D, Khan I. *Constituents of **Lepidium meyenii (maca)***. Phytochemistry 59 (2002) 105-110.
9. Muhammad I., Zhao J., Chuck Dunbar D., Khan I. (2001). *Constituents of **Lepidium meyenii "maca"***; National center for natural products research, research institute of pharmaceutical sciences, school of pharmacy, University of Mississippi.).
10. Brako, Lois; Zaruchi, James: *Catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú*. Editorial Missouri Botanical Garden. 1994. Vol.45 (pag.1286).
11. Chacon de Popovic, Gloria. *Análisis Cualitativo de los 33 elementos de la Maca (**Lepidium peruvianum**) y otros alimentos andinos del Perú*. Segundo Curso Nacional de Maca. Huancayo del 3-5 de diciembre de 1998.
12. Chacon Roldan, Gloria. *Estudio Fitoquímico del **Lepidium meyenii Walp***. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de ciencias de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1971 (pag 46).
13. Instituto Nacional de Nutrición 1993. *Composición Química de los Alimentos Consumidos en el Perú*. Ministerio de Salud.
14. Tellez M.R., Khan I., Kobaisy M., Schrader K., Dayan F., Osbrink W. (2001). *Composition of the essential oil of **Lepidium meyenii (maca)***; Natural products utilization research unit, department of pharmacognosy, national center for natural products research, research institute of pharmaceutical sciences, the University of Mississippi.
15. Aliaga C. Rolando. *La Maca (**Lepidium sp.**) recurso genético del Perú*, IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos "Oscar Blanco Galdós" del 22–25 de abril de 1997.
16. Hickey E. Cordova Herrera. Ecología, *Uso y Conservación de la Maca en los Andes Centrales (Junín y Pasco)*. Escuela de Post-Grado. Universidad Agraria La Molina. 1993. (pag.111).

## BIBLIOGRAFIA

17. Salas C. A. Vigor *Inducing Effect of Maca (Lepidium meyenii Walp), and Andean Hipocotil in Mice*. Universidad Peruana Cayetano Heredia (U.P.C.H). Perú. 1998.
18. Kandaswami C., Middleton E. *Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids, Free Radicals in Diagnostic Medicine. A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Armstrong D. Plenum Press, New York, 1994, 366 pp. 351–376.
19. Bast A., Haenen G. R. M. M., *Zin en onzin van antioxidantia*, Pharm. Weekbl., 126 (1991) 600–605.
20. Bast A., Haenen G. R., Doelman C. J., *Oxidants and antioxidants: state of the art*, Am. J. Med., 91 (1991) 2S–13S.
21. Shuker D. E., Atkin W., Bingham S. A., Leuratti C., Singh R., *Malondialdehyde–DNA adducts in relation to diet and disease risk—a brief overview of recent results*, IARC Sci. Publ., 156 (2002) 475–480.
22. Halliwell B., *How to characterize an antioxidant: an update*, Biochem. Soc. Symp., 61 (1995) 73–101.
23. Chaudiere J., Ferrari Iliou R., *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*, Food Chem. Toxicol. 37 (1999) 949–962.
24. Evans P., Halliwell B., *Micronutrients: oxidant/antioxidant status*, Br. J. Nutr., 85 (Suppl. 2) , (2001) S67–S74.
25. Noguchi N., Watanabe A., Shi H., *Diverse functions of antioxidants*, Free Radic. Res., 33 (2000) 809–817.
26. Sies H., Stahl W., Sundquist A. R., *Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids*, Ann. NY Acad. Sci., 669 (1992) 7–20.
27. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Antioxidant defences*, Free Radicals in Biology and Medicine.
28. Evans P., Halliwell B., *Micronutrients: oxidant/antioxidant status*, Br. J. Nutr., 85 (Suppl. 2) , (2001) S67–S74.
29. Mayne S. T., *β-Carotene, Carotenoids, and Disease Prevention in Humans*, FASEB J., 10 (1996) 690–701.
30. Krinsky N. I., *Actions of Carotenoids in Biological Systems*, Annu. Rev. Nutr., 13 (1993) 561–587.
31. Sies H., Stahl W., *Vitamins E and C, β-carotene, and Other Carotenoids as Antioxidants*, Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl) , (1995) 1315S–1321S.
32. Palozza P., *Prooxidant Actions of Carotenoids in Biological Systems*, Nutr. Rev., 56 (1998) 257–265.
33. Schwartz J. L., *The Dual Roles of Nutrients as Antioxidants and Prooxidants: Their Effects on Tumor Cell Growth*, J. Nutr., 126 (1996) 1221S–1227S.
34. Iftikhar S., Lietz H., Mobarhan S., Frommel T. O., *In Vitro β-carotene Toxicity for Human Colon Cancer Cells*, Nutr. Cancer, 25 (1996) 221–230.

## BIBLIOGRAFIA

35. Paolini M., Pozzetti L., Pedulli G. F., Marchesi E., Cantelli-Forti G., *The Nature of Prooxidant Activity of Vitamin C*, *Life Sci.*, 64 (PL), (1999) 273–278.
36. Song J. H., Shin S. H., Ross G. M., *Prooxidant Effects of Ascorbate in Rat Brain Slices*, *J. Neurosci. Res.*, 58 (1999) 328–336.
37. Zhang D., Okada S., Yu Y., Zheng P., Yamaguchi R., Kasai H., *Vitamin E Inhibits Apoptosis, DNA Modification, and Cancer Incidence Induced by Iron-mediated Peroxidation in Wistar Rat Kidney*, *Cancer Res.*, 57 (1997) 2410–2414.
38. Ciaccio M., Valenza M., Tesoriere L., Bongiorno A., Albiero R., Livrea M. A., *Vitamin A Inhibits Doxorubicin-Induced Membrane Lipid Peroxidation in Rat Tissues in Vivo*, *Arch. Biochem. Biophys.* 302 (1993) 103–108.
39. Freyaldenhoven M. A., Lehman P. A., Franz T. J., Lloyd R. V., Samokyszyn V. M., *Retinoic Acid-Dependent Stimulation of 2,2'-Azo bis(2-Aminopropane)-Initiated Autoxidation of Linoleic Acid in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles: A Novel Prooxidant Effect of Retinoic Acid*, *Chem. Res. Toxicol.*, 11 (1998) 102–110.
40. Bolton J. L., Pisha E., Shen L., Krol E. S., Iverson S. L., Huang Z., van Breemen R. B., Pezzuto J. M., *The Reactivity Of O-quinones Which Do Not Isomerize to Quinone Methides Correlates with Alkylcatechol-Induced Toxicity in Human Melanoma Cells*, *Chem. Biol. Interact.*, 106 (1997) 133–148.
41. Morgan J. F., Klucas R. V., Grayer R. J., Abian J., Becana M., *Complexes of Iron With Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties*, *Free Radical Biol. Med.*, 22 (1997) 861–870.
42. Decker E. A., Phenolics: *Prooxidants or Antioxidants*, *Nutr. Rev.*, 55 (1997) 396–407.
43. Sergediene E., Jansson K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Rietjens I. M.C.M. *Prooxidant Toxicity of Polyphenolic Antioxidants to HL-60 Cells: Description of Quantitative Structure-activity Relationships*, *FEBS Lett.*, 462 (1999) 392–396.
44. Yamanaka N., Oda O., Nagao S., *Prooxidant Activity of Caffeic Acid, Dietary Non-flavonoid Phenolic Acid, on Cu<sup>2+</sup>-Induced Low Density Lipoprotein Oxidation*, *FEBS Lett.*, 405 (1997) 186–190.
45. Metodiewa D., Jaiswal A. K., Cenas N., Dickanaité E., Segura-Aguilar J., *Quercetin May Act as a Cytotoxic Prooxidant after its Metabolic Activation to Semiquinone and Quinoidal Product*, *Free Radical Biol. Med.*, 26 (1999) 107–116.
46. Dubey R. K., Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Gillespie D. G., Branch R. A., Jackson E. K., Kagan V. E., *Estrogen and Tamoxifen Metabolites Protect Smooth Muscle Cell Membrane Phospholipids Against Peroxidation and Inhibit Cell Growth*, *Circ. Res.*, 84 (1999) 229–239.

## BIBLIOGRAFIA

47. Kühn-Velten W. N., Pippirs U., *Novel Connections Between NADPH-Induced Lipid Peroxidation and Cytochrome P450 Inactivation, and Antioxidant and Enzyme Protective Properties of Estradiol in Gonadal Membranes*, *Free Radical Res.*, 26 (1997) 125–133.
48. Bolton J. L., Shen L., *P-quinone Methides Are the Major Decomposition Products of Catechol Estrogen O-quinone, Carcinogenesis*, 17 (1996) 925–929.
49. Lacort M., Leal A. M., Liza M., Martín C., Martínez R., Riuz-Larrea M. B., *Protective Effect of Estrogens and Catecholestrogens Against Peroxidative Membrane Damage in Vitro*, *Lipids*, 30 (1995) 141–146.
50. Markides C. S.A., Roy D., Liehr J. G., *Concentration Dependence of Prooxidant and Antioxidant Properties of Catecholestrogens*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 360 (1998) 105–112.
51. Pino A., Araujo L. *Preparación de soluciones acuosas con Povidona, a partir de soluciones extractivas vegetales y la comprobación de su efecto farmacológico en ratas*. Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica UCSM 1987.
52. Miki M., Tamai H., Mino M., Yamamoto Y., Niki E., *Free-Radical Chain Oxidation of Rat Red Blood Cells by Molecular Oxygen and its Inhibition by  $\alpha$ -Tocopherol*. *Biochemistry and Biophysics* Vol. 258 pp. 373-380, 1987.
53. Sato Y., Kamo S., Takahashi, and Suzuki Y., *Mechanism of Free Radical-Induced Hemolysis of Human Erythrocytes: Hemolysis by Water-Soluble Radical Initiator*. *Biochemistry* 1995, 34, 8940-8949.
54. Hopkins K., Hopkins B.R., Glass G. *Estadística Basica Para las ciencias sociales y del comportamiento*. Prentice-Hall Hispanoamerica, S:A. Tercera Edición , 1997.
55. Téllez M; Khan I; Kobaisy M; Schrader K; Dayan F; Weste O. *Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (walp)*. *Phytochemistry* 61(2002) 149-155.
56. Gonzales G, Córdova A, Vega K, Chung A. *Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men* *Andrologia* 34, 367-372 (2002).
57. Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. *Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* walp.)*
58. Cicero A, Piacente S, Plaza A, Sala E, Arletii R, Pizza C. *Hexanic maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic Maca extracts*.
59. Lanping M, Zaiqun L, Bo Z, Li Y, Zhongli L., *Chinese Science Bulletin* Vol. 45:22, (2000) 2052-2056.

