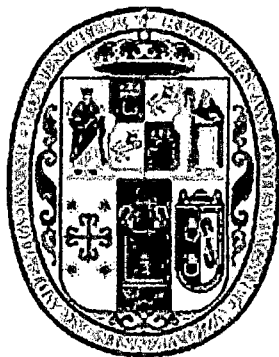


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD
DEL CUSCO**

**FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



**ANTOCIANINAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN DOS CLONES DE PAPA NATIVA DEL GENERO *Solanum*
DE PULPA AZUL Y ROJA**

TESIS PRESENTADO POR:

Br. JULI MAMANI, Deysi Margarita

Br. ARIAS JORDAN, Esdenka

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ASESORES:

Mgt. Emma Jesús Urrunaga Soria

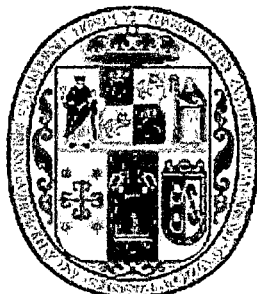
Qco. Julia Dolores Montufar Avendaño

Ing. Bernardo Jorge Rojas

SICUANI - CUSCO - PERÚ

2011

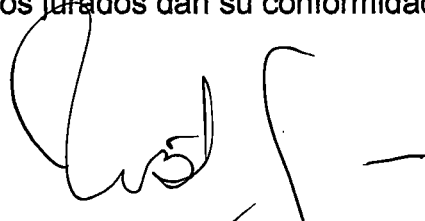
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



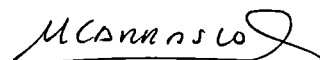
En cumplimiento al reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, se procedió al sustento oral y público del trabajo de tesis intitulada.

**"ANTOCIANINAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN DOS CLONES DE PAPA NATIVA DEL GENERO *Solanum* DE PULPA
AZUL Y ROJA"**

Acto en que los señores del jurado realizaron las observaciones, preguntas y alcances; en fe de ello los jurados dan su conformidad.



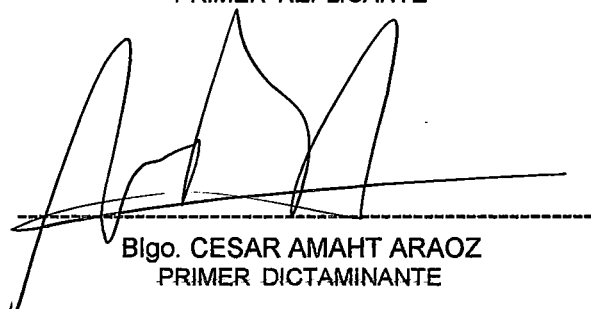
Econ. WILVER BARRIENTOS GUZMÁN
PRESIDENTE



Mgt. MARIA MERCEDES CARRASCO COLQUE
PRIMER REPLICANTE



Ing. UBER QUISPE VALENZUELA
SEGUNDO REPLICANTE



Bigo. CESAR AMAHT AROZ
PRIMER DICTAMINANTE



Ing. MIRIAM CALLA FLOREZ
SEGUNDO DICTAMINANTE

PRESENTACIÓN

**SEÑOR DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL,
SEÑORES CATEDRATICOS MIEMBROS DEL JURADO.**

De conformidad con El Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ponemos a consideración el trabajo de investigación intitulado: “ANTOCIANINAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DOS CLONES DE PAPA NATIVA DEL GENERO *Solanum* DE PULPA AZUL Y ROJA” para optar al Título de Ingeniero Agroindustrial.

Deysi Margarita Juli Mamani
Esdenka Arias Jordan

DEDICATORIA

A Dios, por las personas que puso en mi camino.

A mis padres Julián y Marina, por darme la vida, haber formado la persona que soy y por brindarme la mejor herencia de esta vida, una profesión. Por darme el amor, esfuerzo, apoyo moral, comprensión y motivación para realizarme profesionalmente. Son inigualables.

A mis hermanos Alexander, Aleday y Benedicto por estar conmigo en los momentos de tristeza y alegría, por su apoyo y comprensión para seguir adelante.

A mi tía Feliciano por su apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

Deysi

DEDICATORIA

A Dios por ser mi refugio, por darme fuerza y valor para enfrentar las adversidades, pero sobre todo por ser mi guía en mi vida.

A mis padres Augusta y Jose, hermanos Irma, Oscar, Jaime y Coco por creer en mí, apoyarme en todo momento y alimentar con su amor todos mis sueños.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional, a mi esposo Aurelio, amigo confidente y padre de mi hijo.

A mi hijo Marco Aurelio razón de mi vida que con su presencia hacen cada día el mejor de todos.

Esdenka

AGRADECIMIENTOS

- Nuestro agradecimiento y gratitud a la UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAB DEL CUSCO, a nuestra FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL.
- Agradecemos a nuestros asesores Mgt. Emma Jesús Urrunaga Soria, Qco Julia Dolores Montufar Avendaño y Ing. Bernardo Jorge Rojas, por su apoyo, constante asesoría y orientación en la realización del trabajo de investigación.
- Al Centro de Investigación de la Universidad Nacional de San Antonio Abab del Cusco por el apoyo económico brindado para la realización de la tesis.
- Al laboratorio de Bioquímica y al Centro de Plantas Alimenticias y Medicinales (CEPLAM) UNSAAC, por permitir la realización experimental del presente trabajo.
- Al Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) a cargo del Ing. Ladislao Palomino, por facilitarnos la materia prima para la realización del presente trabajo.
- A todos los docentes de nuestra facultad que nos brindaron su colaboración y amistad.
- A todos los que colaboraron y ayudaron en la realización del presente trabajo de investigación.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Actividad Antioxidante
ABTS	Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin- 6-sulfónico)
AN	Antocianina Individual
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CIP	Centro Internacional de la Papa
Cy-3-glu	Cianidina-3-glucósido
DIP	2,6-Dicloroindofenol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracil
EROs	Espécies Reactivas de Oxígeno
FRAP	Poder Reductor Férrico/Antioxidante
h	heredabilidad
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IC 50%	Concentración inhibitoria al 50%
KOH	Hidróxido de potasio
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
MAC	Contenido de Antocianinas Monoméricas
MF	Muestra Fresca
MS	Muestra Seca
M ₈ O ₂₃	Molibdemo
Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de sodio
NO [•]	Radical óxido de nitrógeno
¹ O ₂	Oxígeno Singulete
O ₂ ^{••}	Radical Superóxido
[•] OH	Radical Hidróxilo
ONOO ⁻	Radical Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno
RL	Radical Libre
RO [•]	Radical Alcoxilo
ROO [•]	Radical Peróxido
SEN	Microscopía Electrónica de Barrido
TAC	Total de Antocianinas
TBHQ	Butilhidroquinona terciaria
TEC50%	Tiempo de Equilibrio de Concentración al 50%
TCA	Ácido Tricloroacético
Vis	Visible
W ₈ O ₂₃	Wolframio
α	Nível de confianza

INDICE GENERAL

RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	ix
ANTECEDENTES	x
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	xi
OBJETIVOS	xii
HIPOTESIS	xii
JUSTIFICACIÓN	xiii

CAPITULO I

REVISION BIBLIOGRÁFICA

	Pag.
1.1. La papa	1
1.1.1. Generalidades y clasificación	1
1.1.2. Taxonomía y descripción botánica	2
1.1.3. Generalidades y composición química de las papas nativas	4
1.1.4. Germoplasma de papa	6
1.1.5. Valor agregado de las papas nativas	8
1.2. Compuestos fenólicos	9
1.2.1. Estructura química y clasificación	9
1.2.2. Actividad biológica de los compuestos polifenólicos	10
1.2.3. Métodos de cuantificación de compuestos polifenólicos	11
1.3. Antocianinas	12
1.3.1. Estructura de las antocianinas y color	12
1.3.2. Biosíntesis de las antocianinas	14
1.3.3. Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas	14
1.3.4. Actividad biológica de las antocianinas	16
1.4. Capacidad antioxidante	17
1.4.1. Radicales libres	17
1.4.2. Función antioxidante	19
1.4.3. Características de los antioxidantes	21
1.4.4. Métodos de determinación de la actividad antioxidante	22

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución	24
2.2. Materia prima	24
2.3. Materiales	25
2.4. Métodos de análisis	26
2.4.1. Determinación de humedad y materia seca	26
2.4.2. Obtención y acondicionamiento de la muestra	27
2.4.3. Microscopia electrónica de barrido	28
2.4.4. Determinación de antocianinas	28
2.4.4.1. Extracción de antocianinas	28
2.4.4.2. Cuantificación de antocianinas	30
2.4.4.3. Diseño experimental	32
2.4.4.4. Análisis estadístico	35
2.4.5. Determinación de polifenóles totales	35
2.4.5.1. Extracción de polifenóles	35
2.4.5.2. Cuantificación de polifenóles totales	35
2.4.6. Determinación del ácido ascórbico (vitamina C)	36
2.4.6.1. Preparación del extracto	36
2.4.6.2. Curva estándar para el ácido ascórbico	36
2.4.7. Determinación de carotenoides totales	37
2.4.7.1. Preparación del extracto	37
2.4.7.2. Curva estándar para el β -Caroteno	37
2.4.8. Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	38
2.4.8.1. Preparación del extracto	38
2.4.8.2. Determinación del tiempo de inhibición 50%	38
2.4.8.3. Determinación de la concentración inhibitoria 50% de DPPH (IC50%) del extracto	39
2.4.8.4. Determinación de la concentración inhibitoria 50% de DPPH (IC50%) del ácido ascórbico	40

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Del análisis físico-químico	42
3.2. De la evaluación microscópica del liofilizado de clones de papas nativas	43
3.3. De la influencia de los parámetros de extracción sobre el contenido de antocianinas	44
3.3.1. Análisis de datos para el contenido de antocianinas en el clon 304239 (Azul)	45
3.3.2. Análisis de datos para el contenido de antocianinas en el clon 303851 (Rojo)	46
3.4. Contenido de antocianinas totales	48
3.5. Contenido de polifenóles totales	50
3.6. Contenido ácido ascórbico	51
3.7. Contenido de carotenoides totales	53
3.8. Actividad antioxidante	54
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

	Pag.
CUADRO 1: Especies nativas	2
CUADRO 2: Comparación de los componentes de las papas cultivadas	5
CUADRO 3: Absorbancia de las diluciones a la máxima longitud de onda	31
CUADRO 4: Procedimiento para la preparación de la curva patrón de polifenóles	36
CUADRO 5: Procedimiento para la preparación de la curva patrón de Ácido ascórbico	37
CUADRO 6: Procedimiento para la preparación de la curva patrón del β - Caroteno	38
CUADRO 7: Determinación de la inhibición del radical DPPH – Procedimiento para la preparación de muestras	39
CUADRO 8: Determinación de la inhibición del radical DPPH – Procedimiento para la preparación del blanco de muestras	40
CUADRO 9: Determinación de la inhibición del radical DPPH frente al ácido ascórbico	41
CUADRO 10: Análisis químico proximal en dos clones de papa nativa	42
CUADRO 11: Análisis de Varianza para el Clon 304239	45
CUADRO 12: Análisis de Varianza para el Clon 303851	46
CUADRO 13: Contenido de antocianinas totales en dos clones de papa nativa	48
CUADRO 14. Concentración de antocianinas de papas moradas y rojas expresados en (mg de cianidina-3-glucósido/100g MF)	49
CUADRO 15: Contenido de polifenóles totales en dos clones de papa nativa	50
CUADRO 16: Contenido de ácido ascórbico en dos clones de papa nativa	51
CUADRO 17: Contenido de carotenoides totales en dos clones de papa nativa	53
CUADRO 18: Tiempo de inhibición al 50% en dos clones de papa nativa	54
CUADRO 19: Capacidad Antioxidante a IC 50% de los extractos Azul, Rojo y vitamina C	57

INDICE DE FIGURAS, DIAGRAMAS Y TABLAS

	Pag.
Figura 1. Partes de la planta de papa	3
Figura 2. Papas nativas con piel y pulpa de colores	4
Figura 3. Estructura química de los polifenóles	10
Figura 4. Estructura de las antocianinas	13
Figura 5. Formación de especies reactivas de oxígeno	18
Figura 6. Daños producidos por los radicales libres	19
Figura 7. Interacción de radicales libres con antioxidantes	20
Figura 8. Clones de papas nativas estudiadas en la presente investigación	24
Figura 9. Diagrama de flujo para el acondicionamiento de la papa	28
Figura 10. Diagrama de flujo para la extracción de antocianinas de clones de papa nativa	30
Figura 11. Microfotografías 1.5kx, 1.0kx y 500x, de almidón de papa pigmentada: Clon azul (A) Y Clon rojo (B)	44
Figura 12. Contenido de antocianinas presentes en los dos clones de papa nativa a diferentes solventes y pH	47
Figura 13. Contenido de antocianinas totales presentes en los dos clones de papa nativa	48
Figura 14. Contenido de polifenóles totales presentes en los dos clones de papa nativa	50
Figura 15. Contenido de ácido ascórbico presentes en los dos clones de papa nativa	52
Figura 16. Contenido de carotenoides totales presentes en los dos clones de papa nativa	53
Figura 17. Tiempo Vs. Porcentaje de inhibición del radical DPPH inhibido por el extracto de papa del clon azul y clon rojo	54
Figura 18. Concentración del Extracto Azul Vs Porcentaje de Captación de Radicales Libres	55
Figura 19. Concentración del Extracto Rojo Vs Porcentaje de Captación de Radicales Libres	56
Figura 20. Concentración de Vitamina C Vs Porcentaje de Captación de Radicales Libres	56

Diagrama 1. Esquema experimental del proceso de extracción de antocianinas	32
Diagrama 2. Esquema del diseño experimental para evaluar los efectos de solvente y pH en la extracción sobre el contenido de antocianinas.	34
Tabla 1. Descripción de las muestras	24

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1. Bandas de absorción
- ANEXO 2. Determinación de polifenoles totales
- ANEXO 3. Determinación de ácido ascórbico
- ANEXO 4. Determinación de carotenoides totales
- ANEXO 5. Determinación del porcentaje de inhibición
- ANEXO 6. Análisis físico químico
- ANEXO 7. Resultados de la cuantificación de antocianinas
Totales
- ANEXO 8. Gráficos de efectos principales para el contenido de
Antocianinas
- ANEXO 9. Determinación de la capacidad antioxidante
- ANEXO 10. Fotografías

RESUMEN

En el presente estudio se determinó el contenido de antocianinas, polifenóles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género *Solanum* de pulpa azul (clon 304239) y roja (clon 303851).

Se determinó el efecto de pH (3.0, 4.0) y solvente (acetona, etanol) en la extracción sobre el contenido de antocianina, de acuerdo a los resultados del análisis estadístico realizado para ambos clones indica que existen diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05 en el contenido de antocianinas entre los dos solventes, sin embargo existe diferencia significativa en el pH para el clon 304239 y no así para el clon 303851. El contenido de antocianinas presentes en el clon 304239 y clon 303851 fueron 0.8044 y 0.1683 mg Cy-3-glu/ g MF respectivamente.

El contenido de polifenoles totales encontrados fueron de 1.836 y 1.082 mg ácido gálico/ g MF para el clon 304239 y clon 303851 respectivamente. El contenido de carotenoides presentes fueron 10.405 y 4.860 ug β -caroteno/g MF para el clon 304239 y clon 303851 respectivamente. Los valores de ácido ascórbico obtenidos fueron 7.943 y 7.371 ug \hat{a} ascórbico/g MF para el clon 303851 y clon 304239 respectivamente.

Se determinó la capacidad antioxidante a una Concentración Inhibitoria del 50% (IC50%), el clon 304239 (27.52 ug/ml) mostró menor concentración que el clon 303851 (76.15 ug/ml), dado que cuanto menor es el valor de IC50 mayor es el poder antioxidante. Los compuestos funcionales responsables de esta actividad antioxidante en las papas nativas son los ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, ácido ascórbico, carotenoides y tocoferoles

Palabras Claves: Antocianinas, polifenóles totales, ácido ascórbico, carotenoides, actividad antioxidante, género *Solanum*.

INTRODUCCION

Un alimento se considera funcional porque, además de destacar por sus propiedades nutritivas, contiene ciertos elementos, cuyo consumo diario dentro de una dieta equilibrada contribuye a mantener o mejorar nuestro estado de salud y bienestar. La papa es considerado un alimento funcional o fuente de nutraceuticos debido a la presencia de metabolitos secundarios que pueden prevenir enfermedades crónicas o controlarlos una vez desarrollados. Los polifenoles aparecen como parte de esta amplia gama de elementos funcionales y en los últimos años se ha determinado su fuerte relación con la disminución de enfermedades como el cáncer, debido a su elevada actividad antioxidante. Algunos de estos compuestos aparte de poseer las propiedades mencionadas, se presentan como sustancias útiles para la industria alimentaria tal como es el caso de los pigmentos denominados antocianinas.

En las últimas décadas, la incidencia de enfermedades oncógenas y enfermedades cardiovasculares han aumentado. Esto se debe entre otros factores a la generación de radicales libres producto de fotocatalisis de contaminantes en la atmósfera o de la contaminación del agua por metales pesados, humo del tabaco, hábitos de alimentación.

El consumo de tubérculos frescos de papas nativas por parte de la población andina es muy importante ya que la mayor parte de su producción se destina al autoconsumo. Las papas pigmentadas proveen una fuente natural de fenoles, pues contienen antocianinas que son compuestos hidrosolubles responsables de los colores azul, púrpura y rojo de muchas frutas y vegetales. El contenido de polifenoles y antocianinas presentes en los vegetales están asociados con la salud debido a su actividad antioxidante, por consiguiente la importancia de realizar estudios, como una alternativa de reemplazar los antioxidantes sintéticos (BHT, BHA y TBHQ) por los naturales; entonces las papas pigmentadas constituyen una fuente de alimentos funcionales dándole un valor agregado potencial, lo cual permitiría alcanzar nuevos mercados alternativos como la industria alimentaria incluyendo los mercados de suplementos dietéticos, cosméticos y farmacéuticos.

ANTECEDENTES

- **Lewis, et al., (1997). "Determination of Anthocyanins, Flavonoids and Phenolic Acids in Potatoes. I: Coloured Cultivars of *Solanum tuberosum* L."**

En este estudio las principales antocianinas, flavonóides y ácidos fenólicos de 26 cultivares de *Solanum tuberosum* L, con la cascara, pulpa coloreada, flores y hojas fueron identificadas y cuantificadas usando el método analítico del HPLC. Los tubérculos rojos contienen abundante pelargonidin-3-(p-coumaroyl-rutinósido)-5- glucósido (200-2000 µg/g MF) y peonidin-3-(p-coumaroyl- rutinósido)-5-glucoside (20-400 µg/g MF), los tubérculos ligeramente púrpuras contienen petunidin-3-(p-coumaroyl-rutinósido)-5- glucoside (1000-2000 µg/g MF) más pequeñas cantidades de malvidin-3-(p-coumaroyl-rutinósido)-5- glucósido (20-200 µg/g MF). Los tubérculos purpuras contienen similares niveles de petunidin-3-(p-coumaroyl-rutinósido)-5-glucoside junto a concentraciones altas de malvidin-3-(p-coumaroyl-rutinósido)-5-glucoside (2000-5000 µg/g MF).

La pulpa del tubérculo también contiene ácido clorogénico (300-900 µg/g MF) y otros ácidos fenólicos, concentraciones bajas de flavonóides (30 µg/g MF). La cáscara mostró niveles más altos (1000-4000 µg/g MF) de ácido clorogénico. Las mayores antocianinas en flores fueron los rutinósidos u otros glicósidos de Pelargonidina, Petunidina Malvidina, Cianidina y Delfinidina. Los flavonóides fueron el kaempferol-3-rutinoside y 2 quercetin-rhamnosa- glucósido. Flores y hojas contienen altas concentraciones de flavonóides.

- **Rodriguez, et al.,(1998). "Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes".**

En esta investigación se determinó la composición del pigmento antocianina en papas rojas (*Solanum tuberosum* y *S.stenotomum*), fueron evaluados la composición cualitativa de antocianinas y el contenido de pigmentos de 33 cultivares como posibles fuentes de colorantes naturales de color rojo. El contenido de antocianinas monoméricas fue determinado por el método pH

diferencial, los dos clones NDOP5847-1 y NDC4069 4 se encuentra en un rango de 2 a 40 mg/100g tubérculos de peso fresco. La antocianina fue caracterizada por HPLC, análisis espectral y espectroscopia de masas. Todas las muestras de papa roja mostraron perfiles similares al pigmento pelargonidina-3-rutinósido-5-glucósido acilados con ácido p-cumárico. La presencia de glicoalcaloides en los extractos de color fue detectado por espectroscopia de masas.

Brown, et al.,(2003). "Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins"

Trabajo de investigación que llevaron a cabo estudios de mejoramiento sobre el comportamiento de clones de papa con niveles altos de antocianinas. Los clones de pulpa roja mostraron esta característica en mayor proporción, lo que sugiere un control multigénico del grado de pigmentación.

La pulpa roja varió desde una pigmentación parcial a una pigmentación completa, en el cual el pigmento se encontraba presente en todos los tejidos del tubérculo. La antocianina total varió de 6.9 a 35mg/100g de peso fresco en los clones de pulpa roja y de 5.5 a 17.1 mg en los de pulpa morada; y su contenido en peso seco se ubica entre el de las fresas y las cerezas. La capacidad de absorción del radical oxígeno y la habilidad del plasma para la reducción del hierro revelaron que los niveles de antioxidante en papas de pulpa roja o morada fueron de dos a tres veces mayores que en las papas de pulpa blanca.

Eichhorn y Winterhalter, (2005). "Anthocyanins From Pigmented Potato (Solanum tuberosum L.) Varieties"

En este estudio se demostró que las variedades de papas coloreadas son una rica fuente de antocianinas, en particular de las derivadas aciladas.

De los cultivares "Hermanns Blaue", "Highland Burgundy Red", "Shetland Black", y "Vitelotte" las antocianinas fueron aisladas y caracterizadas, para esto se utilizaron una combinación de extracción en fase sólida, cromatografía contracorriente y HPLC; se lograron separar derivados del ácido cumárico (3-p-coumaroyl rutinósido – 5 - glucósido de Petunidina,

Pelargonidina, Peonidina y Malvidina) además de ello se aisló el ácido clorogénico, también como las respectivas antocianinas no aciladas fueron obtenidas en alta pureza.

- **Lachman y Hamouz, (2005). "Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition"**

En este estudio se demostró que la papa es una fuente importante de antioxidantes en la nutrición humana. Los antioxidantes principales de papa son los polifenoles, ácido ascórbico, los carotenoides, tocoferoles, y el selenio. La mayoría de los antioxidantes polifenólicos contenidos en papas son la L-tirosina, ácido cafeico, clorogénico y cryptoclorogénico y ácido ferúlico. En papas pigmentadas de pulpas rojas y púrpuras el contenido de antocianinas aciladas son dos o tres veces más altos en antioxidantes en comparación con la papa de pulpa blanca, los tubérculos de papa roja contienen glucósidos de pelargonidina y peonidina, papas moradas glucósidos de malvidina y petunidina, nuevas variedades de papa de pulpa roja y púrpura son utilizados para la industria alimentaria y no alimentaria.

- **Campos, et al., (2006). "Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*), Oca (*Oxalis tuberosa Molina*) and ulluco (*Ullucus tuberosus Caldas*)"**

En esta investigación se estudiarón 4 especies de tubérculos andinos endémicos y domesticados en los andes, papa nativa (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*), oca (*Oxalis tuberosa Molina*) y ulluco (*Ullucus tuberosus Caldas*), observándose su capacidad antioxidante asociada a sus metabolitos secundarios. La capacidad antioxidante se midió usando el método del radical ABTS- y los fenoles totales, carotenoides, antocianinas, betaxantinas y betacianinas también fueron caracterizados.

La capacidad antioxidante encontrada en los cultivos estudiados está en el rango de 483 a 9800 µg trolox equiv/g, fenoles en el rango de 0.41 a 3.37mg ácido clorogénico equiv/g, antocianinas en el rango de 0.08 a 2.05mg Cianidina 3-glucosido/g y los carotenoides en el rango de 1 a 25 µg

β -caroteno/g. El contenido de componentes bioactivos fue alto y variable entre los diferentes cultivos y el genotipo.

- **Andre et al., (2007). "Andean Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a Source of Antioxidant and Mineral Micronutrients".**

Trabajo de investigación que evaluaron los tubérculos de papa como una fuente de antioxidantes y minerales para la dieta. Muestras de cultivares nativos genéticamente diversa de *Solanum tuberosum* L. en los Andes de América del Sur fue obtenida de una colección de casi 1000 genotipos utilizando marcadores microsatélites. Esta colección de 74 landraces, representantes de la principal diversidad genética de papa del germoplasma, fueron analizadas para la determinación de hierro, zinc, calcio, fenoles totales, carotenoides totales y contenido de vitamina C. La capacidad antioxidante hidrófilica de cada genotipo también estaba medida utilizando el ensayo de la Capacidad de Absorbencia del Radical Oxígeno (ORAC). El contenido de hierro fue desde 29.87 a 157.96 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (MS), el contenido zinc de 12.6 a 28.83 $\mu\text{g/g}$ de MS, y el contenido calcio de 271.09 a 1092.93 $\mu\text{g/g}$ de MS. El contenido fenólico total vario entre 1.12 y 12.37 mg eq de ácido gálico/g de MS, el contenido total de carotenoides vario entre 2.83 y 36.21 $\mu\text{g/g}$ de MS y el contenido total de vitamina C vario entre 217.70 y 689.47 $\mu\text{g/g}$ de MS. El rango de valores hidrófilos ORAC fue 28.25-250.67 μmol de eq Trolox/g de MS. La capacidad antioxidante hidrófilica y el contenido fenólico total fue alta y positivamente correlacionado. Sin embargo, este estudio demostró la amplia variabilidad de micronutrientes elevados con promoción a la salud de papa nativas dentro del germoplasma, así como también la contribución significativa de distintos tubérculos de papa pueden impartir el consumo alimenticio de antioxidantes, hierro y zinc.

- **Chirinos, et al., (2007). "Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers"**

Determinó las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos, antocianinas, flavonoides y la actividad antioxidante con dos

genotipos de mashua. Se determinaron mediante método convencional líquido-sólido. El contenido de fenoles y actividad antioxidante fueron afectados por el tipo de disolvente, el pH, la proporción de solvente-agua y el tiempo de extracción. En general, no hubo diferencias significativas en la recuperación de fenoles totales y los valores ORAC al utilizar metanol al 90% y metanol / acetona / agua (45/45/10), ambos con 0,1% de HCl. Por el contrario, la solución de metanol al 90% con 0,1% HCl obtuvieron los más altos niveles de antocianinas, mientras que la mezcla de disolvente extrae altos niveles de flavanoles. Los extractos purificados de los genotipos de mashua presentaron fenoles totales y el contenido de ORAC dentro de los rangos 14.4-18.7 equivalentes mg de ácido gálico / g de MS y 221-359 equivalentes moles de Trolox / g MS, respectivamente. Los perfiles de HPLC-DAD obtenidos de la purificación de extractos fenólicos de los dos genotipos de mashua mostraron diferencias en las proporciones (% del área total a 280 y 520 nm) en función de los solventes seleccionados en este estudio. El alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante que se encuentra en los extractos purificados para ambos genotipos de mashua, indico que los extractos de mashua podrían ser considerados como una fuente potencial de nutraceuticos en el futuro.

Lachman, et al., (2008). "Cultivar Differences of Total Anthocyanins And Anthocyanidins In Red And Purple-Fleshed Potatoes And Their Relation To Antioxidant Activity".

En esta investigación se determinó el total de antocianinas (TAC) y las antocianidinas individual (AN) luego de la hidrólisis, en la pulpa morada de 15 cultivares distintos de papas producidos en 5 diferentes localidades de República Checa. El total de antocianinas expresadas en el contenido de Cianidina varia entre 0.7 mg/100g MF (cv. Blue Congo) y 74.3 mg/100 g (cv. Blaue Ludiano). Se determinó la actividad antioxidante (AA) in vitro por los métodos de ensayo: ABTS, FRAP y DPPH. Alta AA se observaron en los cultivares de Vitelotte, Blaue Ludiano, Hafija, y Highland Burgundy Red. Incrementándose por encima del nivel del mar, precipitaciones anuales altas, y promedios bajos de temperatura anuales causaron alta AA y TAC. Un alto grado de hidroxilación y/o metoxilación de antocianinas individuales

pueden contribuir en conjunción con otros fenoles a alta AA (Peonidina, Delfinidina y Malvidina en los cultivares de Blue Congo, Highland Burgundy Red and Shetland Black).

Consecuentemente los nuevos cultivares de pulpa roja y purpura con altas TAC y altamente metoxiladas y/o hidroxiladas AN, pueden ser una fuente promisoría de antioxidantes en la dieta humana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los radicales libres son causantes de numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena, estas reacciones son eliminadas por la acción de otras moléculas, los llamados antioxidantes. Comúnmente se utilizan antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) en la conservación del alimento; sin embargo, recientemente ha surgido preocupación debido a su posible toxicidad, limitando su utilidad.

Frente a ésta situación se refleja la necesidad de encontrar antioxidantes efectivos provenientes de fuentes naturales para ser utilizados en la industria alimentaria. Dentro de los polifenóles, los flavonóides presentan funciones antioxidantes y atraparoras de radicales libres que se traducen en acciones anticarcinogénicas.

El desconocimiento de nuevas fuentes de antioxidantes naturales nos obliga a la realización de estudios fundamentales de los polifenóles con relación a la capacidad antioxidante de fuentes no convencionales. La región andina es bien conocida por la gran diversidad genética en diferentes tipos de cultivos nativos que desafortunadamente han sido pobremente estudiados. Los cultivos nativos muestran variabilidad en colores, formas, tamaños, constituyentes nutricionales primarios y metabolitos bioactivos secundarios. Siendo una fuente rica de antioxidantes en la dieta humana la papa pigmentada (Genero *Solanum*.), por lo que nos planteamos la siguiente interrogante:

¿Cuál será la relación entre el contenido de antocianinas y polifenóles con la capacidad antioxidante de los clones de papa pigmentada?

¿Cuál es la capacidad antioxidante de los clones de papa nativa de pulpa azul y roja?

OBJETIVOS

- Objetivo general.

Determinar el contenido de antocianinas, polifenóles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género *Solanum* de pulpa azul (clon 304239) y roja (clon 303851).

- Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de pH y solvente en la extracción sobre el contenido de antocianinas en los dos clones en estudio.
- Determinar la concentración de polifenóles totales, ácido ascórbico y carotenoides.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto de papa nativa, a través del ensayo de la decoloración del radical DPPH.

HIPÓTESIS

La capacidad antioxidante de los clones de papa nativa esta relacionada con el contenido de antocianinas, polifenóles totales, ácido ascórbico y carotenoides totales.

JUSTIFICACIÓN

Los compuestos polifenólicos han sido asociados con la salud debido a su capacidad antioxidante. Las propiedades funcionales de papas pigmentadas como colorantes naturales y antioxidantes se presentan como sustancias útiles para la industria alimentaria, debido a la preocupación que va aumentando la seguridad toxicológica de sus contrapartes sintéticas, los cuales tienen efectos colaterales, dañinos para la salud. En los últimos años se ha generado un interés por el estudio de antioxidantes de origen natural, los cuales se encuentran en una gran variedad de alimentos.

La producción y el desarrollo comercial de papas nativas de pequeños productores alto andinos y el Centro Internacional de la Papa ha mostrado interés a partir del año 1993, promoviendo y mejorando genéticamente las variedades de papas nativas que depende de las condiciones del ambiente de producción, del genotipo y de la interacción entre el genotipo y el ambiente, lo que indica la posibilidad de mejorar la cantidad de compuestos polifenólicos que poseen propiedades antioxidantes con efectos anticancerígenos, es así que propone un respaldo sólido a las instituciones comprometidas con la revalorización de este cultivo, proyectos como INCOPA, CAPAC-Perú, T'ikapapa, entre otros que promueven su consumo, transformación y comercialización.

Con la finalidad de prolongar la vida útil de estos cultivos y de abrir nuevos mercados aprovechando su biodiversidad, es que se pretende utilizar las papas nativas como alternativas tecnológicas para el procesamiento de diferentes productos que permita conservar sus características. El mercado de la papa procesada se incrementa con mayor velocidad con respecto a la papa en tubérculo, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Es necesario obtener una mejor imagen de las papas nativas, la mayoría de variedades nativas se destaca por su versatilidad para el procesamiento de diversos productos como puré deshidratado, mezclas alimenticias, fritura, y en menor medida conservas, esto logrará no solo incrementar la cantidad de compra sino que al mismo tiempo la papa nativa logrará obtener una posición competitiva, permitiendo así la recuperación de la biodiversidad de este cultivo.

CAPITULO I

REVISION BIBLIOGRÁFICA

1.1. LA PAPA

1.1.1. Generalidades y clasificación.

La papa es el cultivo alimentario más importante a nivel mundial, es una planta herbácea anual perteneciente a la familia *Solanaceae*, es un tubérculo comestible caracterizado por tener tallo recto, hojas pinnadas, flores de colores, fruto en baya y puede crecer hasta un metro de altura, es cultivado en climas fríos, en altitudes que van desde los 2000 a los 4000 m.s.n.m.

Los componentes de la papa son controlados en su gran mayoría por los genes, sin embargo, la edad y la madurez de los tubérculos, el clima, el suelo y las prácticas culturales realizadas durante su cultivo, almacenamiento y procesamiento, son factores que tienen también influencia sobre los nutrientes (Lister y Monro, 2000). El Centro Internacional de la Papa (CIP), clasifica a la papa en dos grandes grupos: las silvestres y las cultivadas.

a. Papas silvestres

Son aquellas que crecen espontáneamente, sin cuidado del hombre y generalmente no son comestibles. Son cerca de 188 especies y crecen en una amplia variedad de suelos y climas. Geográficamente se extienden desde Chile hasta el Estado Colorado en los Estados Unidos.

b. Papas cultivadas

También llamada Tarpuy, son aquellas que crecen bajo cuidado del hombre, están representadas por 8 especies y con más de 4000 variedades. Dentro de esta clasificación, se encuentran las papas mejoradas y nativas (Amoros, *et al.*, 2008).

1.1.2. Taxonomía y descripción botánica.

La clasificación taxonómica de la papa nativa, es la siguiente:

Reino:	Vegetal
División:	Fanérogamas
Sub división:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Tubiflorales
Familia:	Solanaceae
Género:	Solanum
Serie:	Tuberosa
Especie:	<i>Solanum spp.</i>

Fuente: Elaborado en base a Huamán, 1986.

La denominación spp, hace mención a subespecies de la especie *Solanum*. El CIP comúnmente considera la clasificación de 8 especies cultivadas (Cuadro 1).

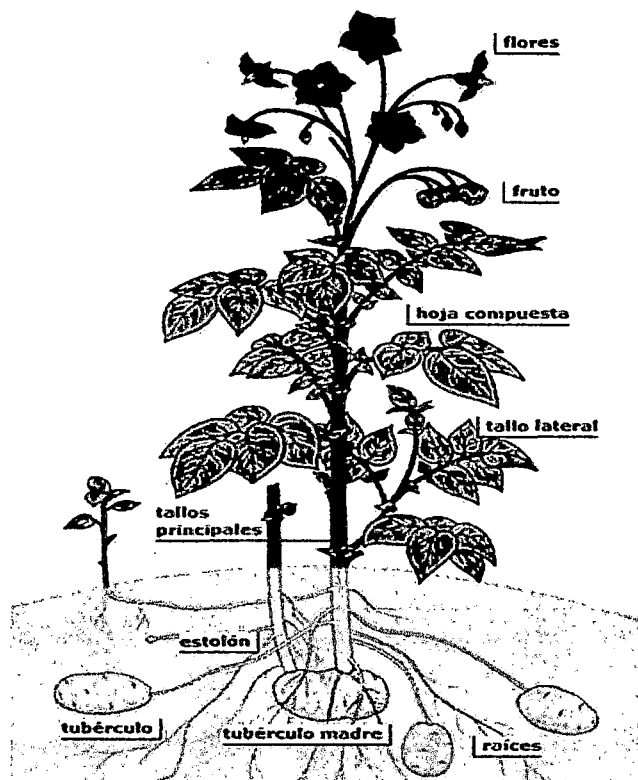
Cuadro 1. Especies nativas.

Especie	Subespecie	Ploidía	N° de entradas
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>tuberosum</i>	$2n=4x=48$	147
	<i>andigena</i>	$2n=4x=48$	2864
<i>Solanum goniocalyx</i>		$2n=2x=24$	87
<i>Solanum stenotomum</i>		$2n=2x=24$	267
<i>Solanum chaucha</i>		$2n=3x=36$	163
<i>Solanum phureja</i>		$2n=2x=24$	196
<i>Solanum juzepczukii</i>		$2n=3x=36$	36
<i>Solanum curtilobum</i>		$2n=5x=60$	6
<i>Solanum ajanhuiri</i>		$2n=2x=24$	14
Total			3866

Fuente: Elaborado en base al CIP, 2008

La papa (figura 1), es una planta herbácea, su hábito de crecimiento cambia entre las especies y dentro de cada especie (Huamán, 1986).

Figura 1. Partes de la planta de papa.



Fuente: CIP, 2008

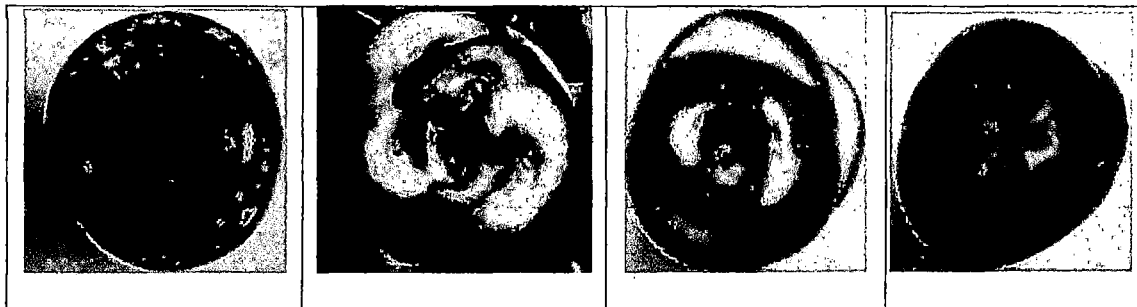
La Serie *Tuberosa*, se caracteriza por sus hojas imparipinadas o simples con folíolos que varían en número, tamaño y forma según las especies y ambientes dentro del cual se desarrollan, su corola rotada o pentagonal y sus bayas redondeadas. La especie *Solanum spp.* se diferencia de las otras especies de la misma serie taxonómica por presentar la articulación del pedicelo en el tercio medio, los lóbulos del cáliz cortos y dispuestos de modo regular. Los tubérculos son tallos modificados que constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta de papa, presenta ojos que se distribuyen por la superficie del tubérculo, la forma del tubérculo varía de acuerdo a la especie: redondas, ovaladas, oblongas y otras con diversidad de formas irregulares. El peridermo o la piel es una capa delgada en el exterior del tubérculo, el color de la piel y pulpa varía entre blanco, amarillo, crema, naranja, rojo o morado; algunos presentan dos colores (Hawkes, 1990).

1.1.3. Generalidades y composición química de papas nativas.

Las papas nativas (*Solanum spp.*), son tubérculos que se cultivan en los andes peruanos, en altitudes que van sobre los 3400 m.s.n.m. donde otros cultivos no prosperan, se caracterizan por su diversidad de formas, tamaños y colores (Figura 2), cuyas variedades presentan piel y pulpa blanca, amarilla, roja, morada y en muchos casos combinaciones vistosas y únicas (Bonierbale, 2002).

Entre las ventajas comparativas de las papas nativas respecto a las mejoradas destacan: su excelente valor proteico, propiedades organolépticas agradables, su cultivo natural y sin agroquímicos, propiedades agrícolas favorables que hacen de estas variedades únicas en el mundo (Amorós *et al.*, 2008).

Figura 2. Papas nativas con piel y pulpa de colores.



Fuente: Palomino, (2008).

Análisis científicos, han demostrado que la gran mayoría de las papas nativas posee mejores características nutricionales en comparación a las papas mejoradas (Gómez *et al.*, 2008). El cuadro 2 se muestra una comparación de los componentes de las papas cultivadas.

Cuadro 2. Comparación de los componentes de las papas cultivadas.

Componente	Unidad	Papa cultivada por 100g	
		Mejorada (Promedio)	Nativa (Promedio)
Energía	Kcal	68,57	89,91
Materia seca	g.	20,00	27,00
Agua	g.	80,00	73,00
Carbohidratos	g.	15,97	20,76
Proteína	g.	1,85	2,43
Grasa	g.	0,09	0,12
Fibra cruda	g.	0,53	0,69
Minerales	g.	0,79	1,04
Vitaminas	g.	0,06	0,08
Componentes no nutritivos	g.	0,71	1,88

Fuente: Elaborado en base a Lister y Monro, (2000); Bonierbale, (2002)

Más que un cultivo capaz de producir una mayor energía por unidad de tiempo y área que cualquier otro, la papa es una buena fuente de proteínas de alto valor biológico, de vitaminas solubles en agua (vitamina C y complejo B), minerales (hierro, zinc, cobre y calcio) y carotenoides. Actualmente, la investigación en los Estados Unidos y Europa está avocada principalmente a la caracterización del contenido de vitaminas y potencial antioxidante de las papas mejoradas, principalmente en su contenido y tipos de antocianinas y carotenoides. Un especial interés al respecto se está dando a aquellos materiales mejorados derivados de *S. phureja* y *S. stenotomun* (Lu *et al.*, 2001; Breithaupt *et al.*, 2002).

Los principales carotenoides de la papa son violaxantina, antheraxantina, luteína y xeoxantina, los que se encuentran en mayor contenido en las papas amarillas que en las blancas. *A priori* la papa no es una buena fuente de β -caroteno, un precursor de la vitamina A, sin embargo mediante ingeniería genética se ha logrado promisoriamente un incremento de xeoxantina y acumulación de β - caroteno en los tubérculos. La identificación de cultivares

nativos o el desarrollo de genotipos con estas características ubicaría a la papa dentro de la categoría de alimentos que pueden contribuir a la salud humana (Romer *et al.*, 2002).

Los glicoalcaloides son compuestos naturales, metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran en varios alimentos incluida la papa, aunque en dosis altas son tóxicas, debido a su actividad anticolinesterasa en el sistema nervioso central y alteración de las membranas celulares, dando lugar a alteraciones en el metabolismo general del cuerpo (Väänänen, 2007).

También puede tener efectos beneficiosos como la reducción del colesterol en la sangre, la protección contra la infección por salmonella y la quimioprevención del cáncer. Los glicoalcaloides son principalmente de dos tipos: α -solanina y α -chaconina, estos dos compuestos representan aproximadamente el 95% de los glicoalcaloides en tubérculos de papa (Jaspreet y Lovedeep, 2009), la exposición a la luz durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento es el factor más importante que influye en el contenido de glicoalcaloides en tubérculos de papa (Magnifique, 2008).

El nivel permitido de glicoalcaloides en los tubérculos es de 20 mg/100 g de peso fresco y la mayoría de variedades de la papa publicadas contienen menos de 10 mg/100g de peso fresco de ambos α -solanina y α -chaconina (Lachman *et al.*, 2001 citado por Magnifique, 2008).

1.1.4. Germoplasma de papa

La papa es uno de los cultivos con mayor diversidad genética. Esta diversidad esta concentrada en la zona Andina de América de Sur, y se encuentra ampliamente distribuida en términos eco-geográficos (Hijmans *et al.*, 2002).

El amplio rango de hábitat en los cuales se encuentran las papas silvestres desde ambientes muy fríos y sujetos a heladas en la sierra Andina, hasta condiciones muy secas de semidesierto demuestra la manera en que estos recursos genéticos se han adaptado al estrés abiótico y han desarrollado resistencias fuertes a un rango de plagas y enfermedades. Aunque la taxonomía sigue estando sujeta a debate, más de 200 especies entre silvestres y cultivadas han sido nominadas (Hawkes, 1990).

En el Perú, la gran diversidad de papas nativas procede principalmente de los campesinos más pobres de la zona andina entre los 3500 a 4500 msnm, y se utiliza mayormente para autoconsumo y/o intercambio con poblados o comunidades cercanas. Los llamados 'productores conservacionistas' que tienen un conocimiento íntimo sobre los atributos y manejo de las papas valoran su sabor, calidad culinaria y adaptación bajo diversos climas y usos. Sin embargo, los cambios sociales, presiones económicas y otros factores como los climáticos, amenazan la continuidad de la conservación de esa diversidad por productores tradicionales. El estatus in-situ de las especies silvestres es aún menos segura, reportándose en el Perú una pérdida de 35 de las 90 especies endémicas (Salas *et al.*, 2001).

La papa cultivada de la zona Andina pertenece a un conjunto de especies diploides (*S. ajanhuiri* Juz. *et* Buk., *S. phureja* Juz. *et* Buk., *S. stenotomun* Juz. *et* Buk.), triploides (*S. chaucha* Juz. *et* Buk., *S. juzepzuckii* Buk.), tetraploides (*S. tuberosum* L. *subsp.* *andigena* Hawkes) y pentaploides (*S. curtilobum* Juz. *et* Buk.), mientras que la papa cultivada en la región litoral del sur de Chile pertenece a la especie tetraploide *S. tuberosum* L. *subsp.* *tuberosum*. Estos grupos cultivados, sin embargo, no son reconocidos por ciertos investigadores como 8 especies independientes, sino como unas pocas o una sola especie (Bonierbale *et al.*, 2004).

S. stenotomum es probablemente el grupo más primitivo, mientras que *S. tuberosum* *subsp.* *andigena* predomina como la papa cultivada más importante en los Andes. El germoplasma mejorado, el cual incluye variedades modernas

y líneas en mejoramiento, es también una fuente importante de recursos genéticos de la papa. (Bonierbale *et al.*, 2004)

1.1.5. Valor agregado de las papas nativas

En los últimos años ha surgido un especial interés en la búsqueda de fuentes naturales de colorantes capaces de reemplazar los pigmentos sintéticos usados en la industria de alimentos. Los pigmentos derivados de la papa con carne roja o púrpura tienen poco olor, son más intensos a pH ácido, lo que podría representar una alternativa natural al Rojo N° 40. En Japón, estos pigmentos parecen ser fuertes y con tendencia a reemplazar al pigmento extraído del rábano rojo gigante. Estudios en E.E.U.U. han demostrado que la producción de pigmentos a partir de la papa podría resultar económicamente provechosa (Reyes *et al.*, 2003).

La cantidad de antocianinas en las papas de color depende de las condiciones del ambiente de producción, del genotipo y de la interacción entre el genotipo y el ambiente, lo que indica la posibilidad de mejorar la cantidad de estos compuestos a través de estudios de caracterización y/o mejoramiento genético, o de manejo agronómico (Bonierbale *et al.*, 2004).

Parte de esta estrategia es la de buscar mejores alternativas y oportunidades para diversificar e intensificar su utilización a escala industrial. A la fecha, más de 300 cultivares con pulpa amarilla y/o pigmentada han sido evaluados por rendimiento, estabilidad y parámetros de procesamiento, así como por sus componentes nutricionales. Una serie de parámetros importantes para la industria como el contenido de materia seca, color de hojuelas fritas y absorción de aceite fueron evaluados en estos cultivares, indicando una alta frecuencia de variedades aptas para fritura por su resistencia al endulzamiento, por ejemplo resistencia a elevar su contenido de azúcares reductores al frío. Cerca de una cuarta parte de los cultivares mostraron un bajo contenido de aceite, asociado con un alto contenido de materia seca y excelente color de hojuelas. Los cultivares de la especie *S. goniocalyx* fueron los más sobresalientes, con sabores excelentes, colores atractivos, etc. La diversidad de formas y patrones de pigmentación de las papas nativas, podrían resultar en

productos novedosos y atractivos. Estas características combinadas a la adaptación a ambientes hostiles, convierte a estas papas en una fuente de germoplasma valioso para el mejoramiento y en una gran oportunidad para los pequeños agricultores para darles un valor agregado a sus papas nativas, al poder ingresar a un mercado potencial, como es la industria de bocaditos y de alimentos saludables (Bonierbale *et al.*, 2004).

1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando mas de 8000 compuestos distintos. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular.

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, tanto frescos como procesados. Su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales esta claramente reconocida, a través de las antocianidinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y sus productos. También se les asocia con la astringencia que presentan muchas frutas comestibles antes de la maduración (Martínez *et al.*, 2000).

1.2.1. Estructura química y clasificación

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o mas grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o mas residuos de azúcar unidos a los grupos hidróxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma mas común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de

glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los asociados a los polifenóles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Martínez *et al.*, 2000).

Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos (Ugartondo, 2009): flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. (Ver figura 3)

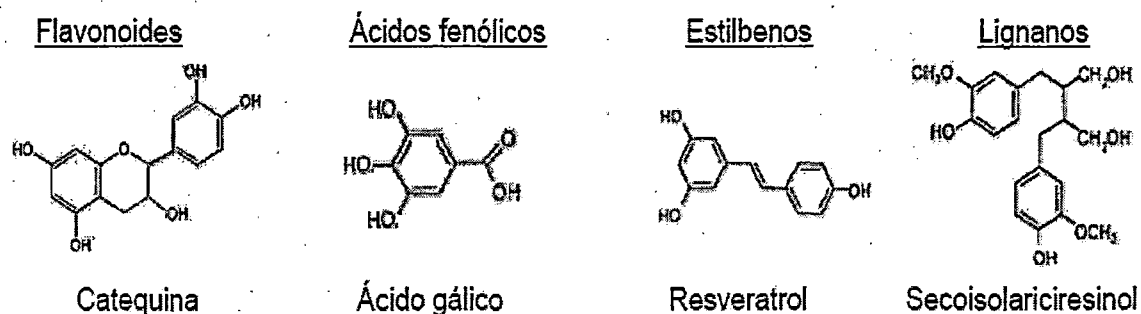


Figura 3. Estructura química de los polifenóles.

1.2.2. Actividad biológica de los compuestos polifenólicos

Los antioxidantes pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando algunos de estos últimos en desuso debido a los estudios que les atribuyen efectos carcinogénicos, este hecho ha despertado un creciente interés en el estudio de los antioxidantes naturales entre los que se encuentran distintos compuestos polifenólicos. La capacidad antioxidante descrita por distintos polifenóles se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades. (Martínez *et al.*, 2000).

Los polifenóles son un gran grupo de compuestos, presentes en la naturaleza y, por ende, en la dieta, cuya estructura química los hace ser potentes antioxidantes, que se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres,

quelación de metales e inhibir oxidasas (Leighton *et al.*, 1999). Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio mas estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidróxilo permite que se deslocalicen los electrones (Ugartondo, 2009).

Entre los polifenóles, un interesante grupo lo constituyen los flavonoides. Hay varios miles de flavonoides diferentes presentes en frutas y verduras, y muchos de ellos tienen una capacidad antioxidantes incluso más alta que las vitaminas A y E (Leighton *et al.*, 1999). Los flavonoides pueden aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes, al mismo tiempo que son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Pérez, 2003).

1.2.3. Métodos de cuantificación de compuestos polifenólicos.

Dentro de los métodos para la cuantificación y/o identificación de compuestos polifenólicos se encuentran las técnicas espectrofotométricas, ensayos ultravioleta y cromatográficas (Martínez *et al.*, 2000 citado por Martínez, 2007).

a) Técnicas espectrofotométricas.

Entre este tipo de técnicas, los métodos usados comúnmente para determinar polifenóles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición del anillo B y el ensayo de Folin- Ciocalteu para la cuantificación de polifenóles totales, esta técnica llegó a ser la mas utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenóles. Este método consiste básicamente en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra.

b) Ensayos ultravioleta.

Se han realizado numerosos estudios para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada

grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Una de las técnicas más empleadas dentro de este grupo es la determinación del ácido clorogénico, el cual se cuantifica después de su extracción con etanol y posterior lectura de la absorbancia máxima a una longitud de onda de 325-328 nm.

c) Técnicas cromatográficas.

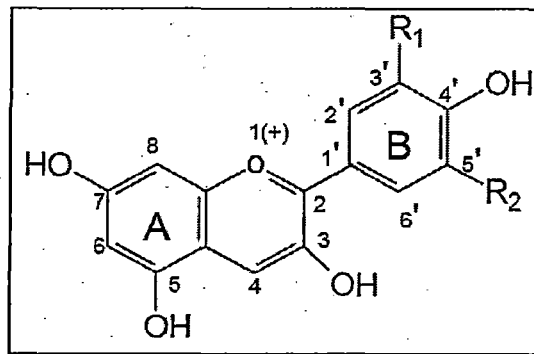
Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos, así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos. Hoy en día, las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las más empleadas para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos. Existen distintos soportes y fases móviles que permiten el análisis de antocianinas, procianidinas, flavonas y ácidos fenólicos. Mediante el empleo de HPLC, se puede determinar un gran número de polifenoles de interés nutricional, como fenoles simples, ácidos fenólicos y sus derivados, y los distintos flavonoides; sin embargo, esta técnica requiere la utilización de métodos de extracción adecuados a cada uno de los compuestos a analizar.

1.3. ANTOCIANINAS

1.3.1. Estructura de las antocianinas y color

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula (Garzón, 2008).

Estructuralmente son derivados polimetoxi y polihidroxilados glicosilados de las sales del 2 – fenil benzopirilio o sales de flavilo (Jin y Lian, 2003). (Ver figura 4).

Figura 4. Estructura de las antocianinas

Fuente: Durst y Wrolstad, (2001).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas (aglicones), pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Durst y Wrolstad, 2001):

- Pelargonidina (Pg) “3, 5, 7, 4’ – tetrahidroxiflavilo”
- Cianidina (Cy) “3, 5, 7, 3’, 4’ - pentahidroxiflavilo”
- Delfinidina (Dp) “3, 5, 7, 3’, 4’, 5’ – hexahidroxiflavilo”
- Peonidina (Pn) “3, 5, 7, 4’ – tetrahidroxi – 3’ – metoxiflavilo”
- Petunidina (Pt) “3, 5, 7, 4’, 5’ – pentahidroxi – 3’ - metoxiflavilo”
- Malvidina (Mv) “3, 5, 7, 4’, – tetrahidroxi – 3’, 5’ - metoxiflavilo” (Jin y Lian, 2003; Lock de Ugaz, 1990)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidróxilo y metóxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Garzón, 2008).

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico,

succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico (Garzón, 2008).

Stintzing *et al.*, (2002) citado por Garzón (2008), demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

1.3.2. Biosíntesis de las antocianinas

Las antocianinas se sintetizan a partir de la condensación de dos moléculas precursoras: malonil Co A y p-cumaril-CoA, las que más tarde formarán anillos A y B respectivamente.

Las antocianinas son sintetizadas por varias rutas. Sobresalen dos, la del ácido shikímico y la del ácido malónico. En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples derivados de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y ciclo de Calvin en diversos ácidos orgánicos como el cinámico, p-coumárico, cafeico, ferúlico, clorogénico y fenilalanina (Cuevas *et al.*, 2008).

Cabe resaltar que esta ruta sintética también es compartida por otros compuestos fenólicos. La principal reacción de biosíntesis de los flavonoides es la condensación de los acilos provenientes de cumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA catalizada por la enzima chalcona isomerasa que lleva a cabo la isomerización de chalcona a flavona, misma que es convertida en flavones o antocianinas. Los pasos finales en la síntesis de antocianinas son las acilaciones y las glicosilaciones, primero en el C-3, para estabilizar el catión flavilio (Cuevas *et al.*, 2008).

1.3.3. Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Wrolstad, 2000;

Cevallos y Cisneros, 2004). Factores como su misma estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

a Efecto del pH.

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal y la forma chalcona, o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Garzón, 2008).

b Efecto de la temperatura

Incrementos en la temperatura resultan una pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de formas incoloras (Garzón, 2008). Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien los procesos térmicos alta temperatura corto tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de 60°C) se degradan según una cinética de primer orden. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas (Fennema, 2000).

c Oxígeno

Las antocianinas son rápidamente oxidadas y degradadas cuando se encuentran principalmente en su forma quinoidal (Fennema, 2000). La remoción de oxígeno protege contra la degradación térmica (Salazar, 2009).

d Ácido ascórbico

Se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, ya que forma peróxido de hidrógeno durante la oxidación del mismo; esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como la quercitina. El peróxido de hidrógeno actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en el C2 produciendo ésteres incoloros (Fennema, 2000).

e Otros factores

La concentración del pigmento y la actividad de agua de la matriz afectan la estabilidad del color. Hoshino *et al.* (1982) citado por Garzón (2008), demostraron que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzón y Wrolstad, 2001; Olaya *et al.*, 2008).

1.3.4. Actividad biológica de las antocianinas

El interés en los pigmentos antocianicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa *et al.*, 1999) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas de oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli *et al.*, 1998).

De igual manera, Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxido (ROO^\bullet), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (OH) y oxígeno singulete (1O_2).

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Hagiwara *et al.*, (2002), demostraron que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores.

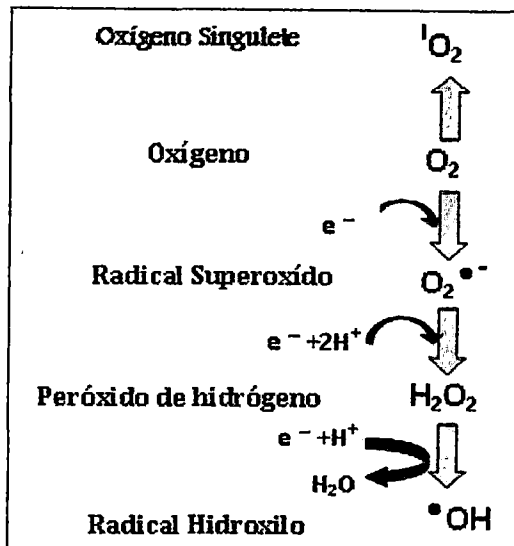
1.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

1.4.1. Radicales libres

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una reactividad alta conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs) (Martínez, 2007).

Especies reactivas de oxígeno es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales (ión superóxido $O_2^{\bullet-}$, radical hidróxilo $^\bullet OH$, alcoxilo RO^\bullet , peróxilo ROO^\bullet y óxido de nitrógeno NO^\bullet) y no radicales (peróxido de hidrógeno H_2O_2 , oxígeno singulete 1O_2 y peroxinitrito $ONOO^-$) que son agentes oxidantes (Avello y Suwalsky, 2006), derivados de procesos fisiológicos normales, como la fosforilación oxidativa y como resultado de la exposición diaria a la radiación ionizante, la contaminación atmosférica, el humo del cigarrillo, algunos fármacos, entre otros (Rojano *et al.*, 2008).

Figura 5: Formación de especies reactivas de oxígeno.

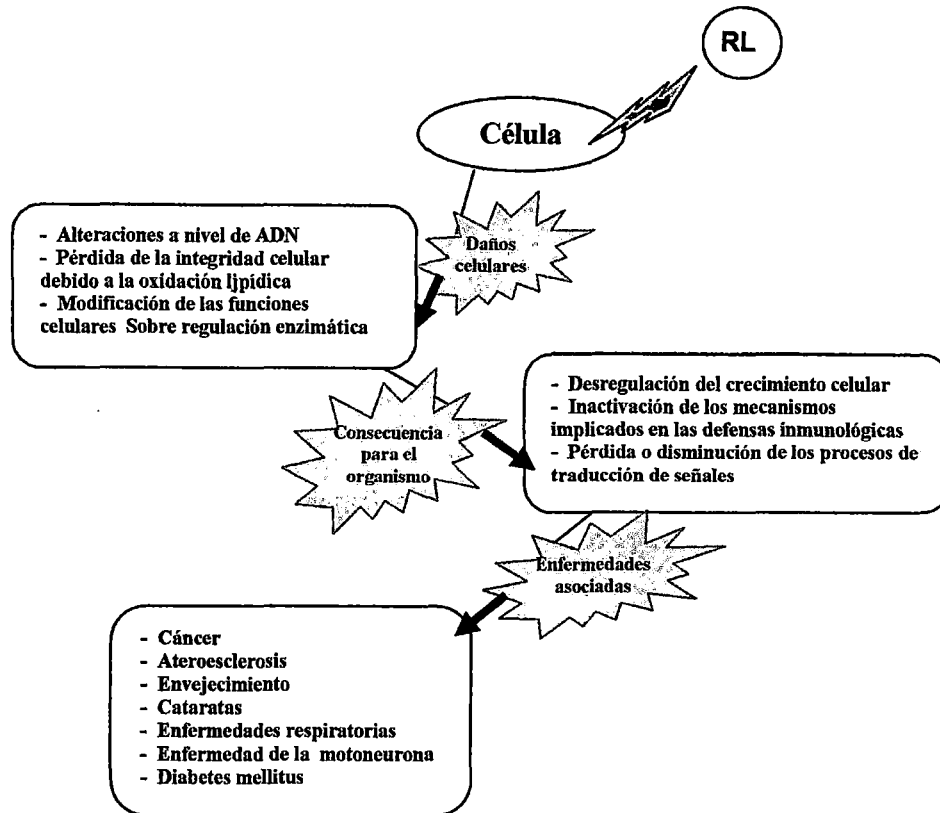


Fuente: Vargas *et al.*, (2007).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello y Suwalsky, 2006).

Cuando el aumento del contenido intracelular de EROs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, glicósidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello y Suwalsky, 2006) (Ver figura 6).

Figura 6. Daños producidos por los radicales libres



Fuente: Avello y Suwalsky, (2006).

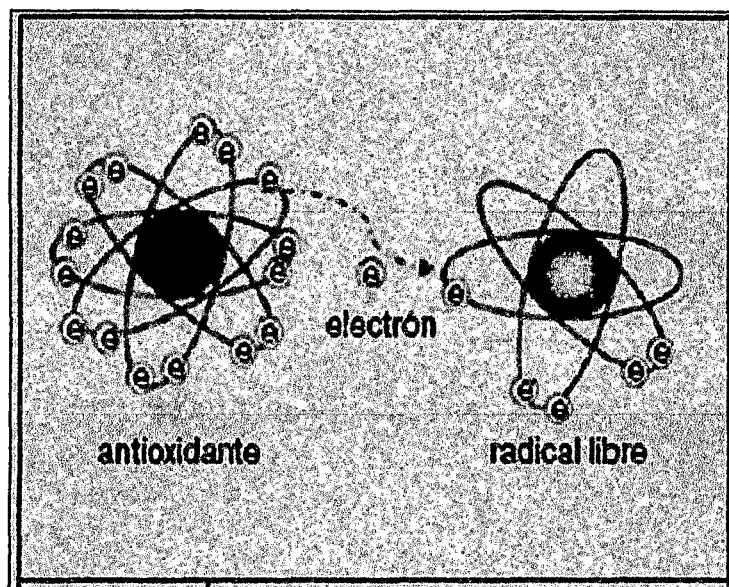
1.4.2. Función antioxidante

Los sistemas biológicos en ambientes oxigenados han desarrollado mecanismos de defensa, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Entre ellos destacan, a nivel fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O_2 en los tejidos y a nivel bioquímico (Martínez, 2007), la célula se protege de los radicales libres mediante la acción de sistemas enzimáticos antioxidantes y de sistemas no enzimáticos (Rojano *et al.*, 2008).

La primera defensa antioxidante es intracelular y es principalmente de tipo enzimático. Las enzimas antioxidantes requieren de la presencia de metales como Cu, Fe, Mg, Zn o Se para su acción, por esto se les llama a veces metales antioxidantes. Las más importantes son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, y requieren Fe, Zn y Cu o Mn, y Se respectivamente (Urquiaga *et al.*, 1999).

La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimático y está dada por compuestos antioxidantes que actúan tanto a nivel celular como extracelular (Urquiaga *et al.*, 1999), está formada por distintos compuestos que atrapan o neutralizan radicales libres, interrumpiendo las reacciones en cadena a través de las cuales se propaga el daño que éstos producen. Para lograrlo, los antioxidantes entregan un electrón a los radicales libres, con lo cual los desactivan el proceso, pero sin transformarse ellos mismos en radicales libres, dada la gran movilidad de sus electrones o por su transformación en radicales libres no reactivos (Leighton *et al.*, 1998). (Ver figura 7)

Figura 7: Interacción de radicales libres con antioxidantes



Fuente: Velázquez *et al.*, (2004).

Esta segunda defensa antioxidante está formada por compuestos, endógenos y exógenos. Los de origen exógeno, es decir, provenientes de la dieta, para ser reemplazados necesitan ser nuevamente ingeridos en ésta. Estos compuestos antioxidantes, llamados hoy Antioxidantes Dietarios, son fundamentales para la prevención de enfermedades ya que son fácilmente modificables. La clave en Antioxidantes Naturales son los Antioxidantes Dietarios, algunos de los cuales están bien establecidos (vitamina C, vitamina E, carotenoides y Se) y otros sustancias que tienen función antioxidante, particularmente los polifenóles (Urquiaga *et al.*, 1999).

El Consejo de Nutrición del Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América (Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences, USA, 1998) propuso en 1998 una definición de Antioxidante Dietario para caracterizar las propiedades biológicas de los compuestos antioxidantes. Esta definición propone que ***un Antioxidante Dietario es una sustancia presente en los alimentos, que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno o ambas, sobre las funciones fisiológicas normales en humanos.*** Con ella, se consideran los criterios de que se trata de una sustancia presente en la dieta humana, cuya cantidad se ha medido en alimentos de consumo común y que disminuye en el organismo los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Leighton *et al.*, 1999).

1.4.3. Características de los antioxidantes

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son, la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo (Martínez, 2007).

La célula es una entidad de estructura compleja. Posee regiones lipofílicas, donde predominan las grasas, como las membranas. Otras regiones, como el citosol, son de naturaleza acuosa. Por ello, el antioxidante tiene que tener características de solubilidad diferente, según donde actúe. En un caso, debe ser soluble en grasas como la vitamina E y carotenoides y en el otro debe ser soluble en agua, como lo es vitamina C. De este modo, tal como se está comprendiendo con las investigaciones más recientes, los antioxidantes difieren unos de otros tanto en su mecanismo como en su sitio de acción. Por ejemplo, β -caroteno es uno de los antioxidantes más efectivos en neutralizar al oxígeno singulete; la vitamina E es el principal protector de las LDL y es uno de los antioxidantes más efectivos como interruptor de reacciones en cadena; la vitamina C nos protege de tóxicos como el humo del cigarrillo (Leighton *et al.*, 1999).

Gordon (1990) citado por Martínez (2007), da una clasificación de los antioxidantes, mencionando que; hay dos tipos principales de antioxidantes, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de olores volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", eliminar el oxígeno singulete, etc.

Por lo anterior se puede definir como antioxidantes en el ámbito de los alimentos como "aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando considerablemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas" (Martínez, 2007).

1.4.4. Métodos de determinación de la actividad antioxidante.

a. FRAP (Poder reductor férrico/antioxidante).

El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}). De este modo se genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra. La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. El ensayo FRAP es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos (Prior *et al.*, 2005).

b. ORAC (Capacidad de absorbancia del radical oxígeno) .

Consiste en la cuantificación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición del ataque radicalario a la fluorescencia por parte del radical (AAPH) 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride (Arrete, 2007).

c. ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

Este método es muy usado para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica y lipofílica, para poder llevar a cabo el método ABTS se tiene que formar el radical catión $ABTS^{\bullet+}$, generado en medio de una reacción que puede ser química (dióxido de magnesio, persulfato de

potasio) o enzimática (peroxidase, mioglobulina), el radical catión $ABTS^{\bullet+}$ posee una coloración verde-azulada (Kuskoski *et al.*, 2005).

d. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil)

El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, estable en medio orgánico. La reducción del $DPPH^{\bullet}$ se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el $DPPH^{\bullet}$ absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece (Brand-Williams *et al.*, 1995).

e. DMPD (Diclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina)

Este método se basa en la reducción del radical catión DMPD por los antioxidantes de la muestra. La generación de este radical requiere un pH adecuado (5.25) y la adición de una solución de cloruro férrico. La absorbancia del radical se determina a 505 nm y los compuestos antioxidantes una vez adicionados, son capaces de transferir un átomo de H^+ , provocando su decoloración, se disuelve en medio acuoso (Arrete, 2007).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Bioquímica de la Carrera Profesional de Química y el laboratorio del Centro de Plantas Alimenticias y Medicinales (CEPLAM) de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Se realizó el análisis químico proximal de la muestra liofilizada en la unidad de prestación de servicio de análisis químico, Departamento Académico de Química – UNSSAC.

2.2. MATERIA PRIMA

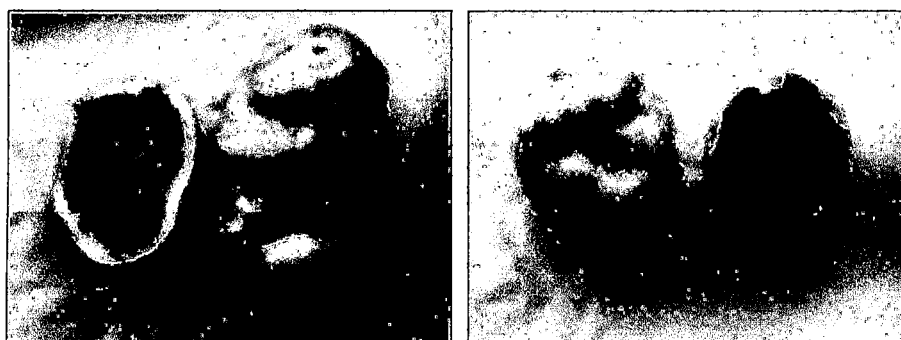
La materia prima utilizada fue clones de papa nativa del género *Solanum* de pulpa azul y roja; las que fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Cusco, Centro de Investigación Andenes del Distrito de Zurite, Provincia de Anta. Son dos muestras de clones de dos especies diferentes, cuya descripción se detalla en la tabla 1 y se muestra en la figura 8.

Tabla 1. Descripción de las muestras.

Muestra	ID ^a	Especies	Variedad
1	303851	<i>S. stenotomum</i> X <i>S. goniocalix</i>	Chingos x Kashpadana amarilla
2	304239	<i>S. stenotomum</i> X <i>S. stenotomum</i>	Cceccorani x Chingos

^a Números de identificación asignados por INIA.

Figura 8: Clones de papas nativas estudiadas en la presente investigación



Clon 303851

Clon 304239

2.3. MATERIALES

a. Equipos

- Agitador magnético (Jerway-Modelo1000)
- Espectrofotómetro UV/VIS (Evolution 300 UV)
- Centrífuga (Zentrifugen EBA-20)
- Liofilizador (Liotop-Modelo101)
- Balanza analítica (GR-200)
- Rotavapor Büchi (Heating Bath B-491)
- Potenciómetro (RS-232)
- Baño maría (Precisterms-140)
- Estufa (Memmert-1200)
- Vortex (VM-300)

b. Materiales de vidrio y otros

- Matraz Erlenmeyer(50ml,100ml)
- Beakers (50ml,100ml)
- Probetas(20ml)
- Pipetas (5ml,10ml)
- Micro pipetas(0.5-10 ul, 10-100ul y 100-1000ul)
- Fiolas (10,20, 50, 100 y 250ml)
- Placas petri
- Embudos de vidrio
- Tubos de ensayo
- Tubo para centrifuga (viales)
- Baguetas
- Mortero
- Papel filtro Whatman N°1
- Papel aluminio
- Otros materiales necesarios para los diferentes ensayos

c. Reactivos

- Metanol 99% (J.T Baker)
- Etanol 96% (J.T Baker)
- Cloroformo (J.T Baker)
- Acetona (E. Merck)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) (Sigma Aldrich)
- Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich)
- Carbonato de sódio (E. Merck)
- Ácido gálico (Sigma Aldrich)
- Ácido acético (J.T. Baker)
- Ácido cítrico (E. Merck)
- Hexano (Fisher Chemicals)
- Eter (J.T. Baker)
- Hidróxido de potasio (Nequimsa)
- 2,6 Dicloroindofenol (E. Merck)
- Ácido ascórbico (Sigma Aldrich)
- Ácido oxálico 0.25 M (Sigma Aldrich)
- Ácido clorhídrico 1 N (J.T Baker)
- Cloruro de potasio 0.025 M (E. Merck)
- Acetato de sódio 0.4 M (E. Merck)
- Ácido tricloroacetico (Riedel)

2.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA

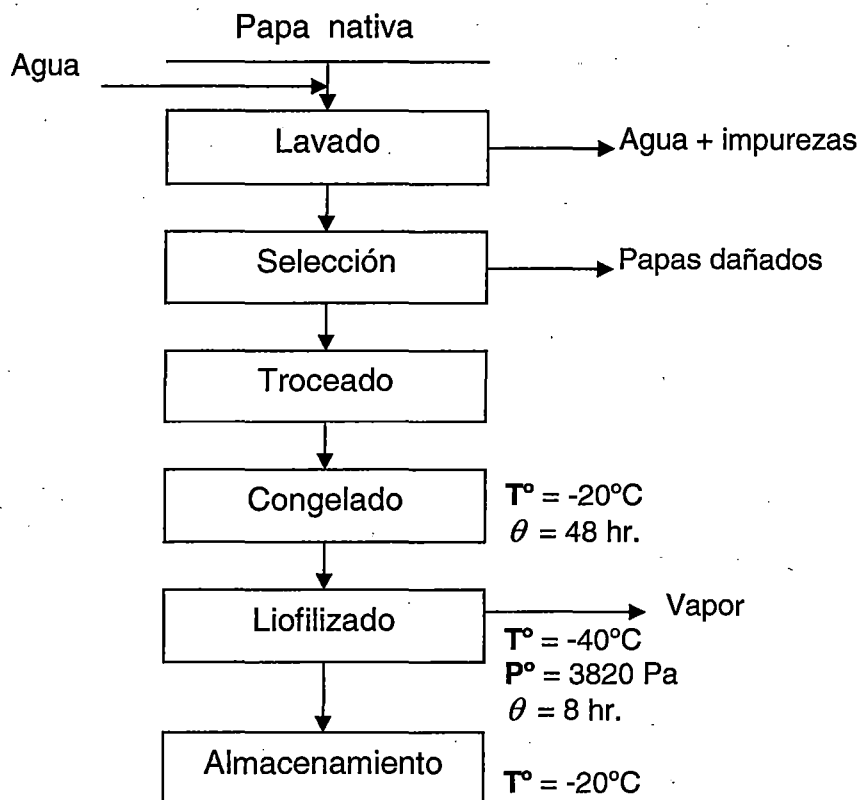
Se utilizó el método gravimétrico porcentual, que consiste en secar la materia en una estufa a 105-110°C durante 24 horas hasta peso constante. El contenido de humedad es el resultado de la diferencia del peso inicial y el final expresado en porcentaje.

2.4.2. OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Se realizó el acondicionamiento de la materia prima para inhibir la actividad de las enzimas y evitar la degradación de los metabolitos secundarios. El flujo de operaciones para la obtención de la papa liofilizada se muestra en la figura 9. Las operaciones se describen a continuación:

- **Lavado:** Los tubérculos de los dos clones estudiados fueron limpiados manualmente con agua, retirando tierra adherida y cualquier otro tipo de elemento extraño.
- **Selección:** Se seleccionan aquellos tubérculos sanos, retirando los que presentan señales de deterioro.
- **Troceado:** Se realizó un rápido troceado para evitar el pardeamiento enzimático, obteniéndose rodajas de 0.1mm de espesor (con cascara).
- **Congelado:** Las rodajas se congelan de forma inmediata por debajo de los -20°C durante 48 horas.
- **Liofilizado:** Las muestras fueron liofilizadas a una temperatura de -40°C y presión de vacío 382 uHg por 8 horas, para evitar que la enzima polifenol oxidasa oxide los polifenoles a compuestos quinónicos que le atribuyen colores oscuros a la papa.
- **Almacenamiento:** Para una mejor conservación de las papas liofilizadas, las muestras fueron congeladas por debajo de los -20°C en frascos oscuros protegidos de la luz con papel aluminio, durante todo el tiempo en que se desarrollaron las pruebas.

FIGURA 9
DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE LA PAPA.



Fuente: Elaboración propia

2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La morfología y la asociación de los gránulos de almidón con el pigmento de los clones de papa nativa se observaron mediante microscopía electrónica de barrido, usando un equipo Vega//Tescan. Las muestras liofilizadas fueron conservadas en congelación, se observaron desde 500x, 1.0kx y 1.5kx a 10Kv, sin preparación previa a presión reducida tratándose de muestras biológicas.

2.4.4. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

2.4.4.1. Extracción de antocianinas

La extracción del pigmento se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito por Giusti y Wrolstad, 2005.

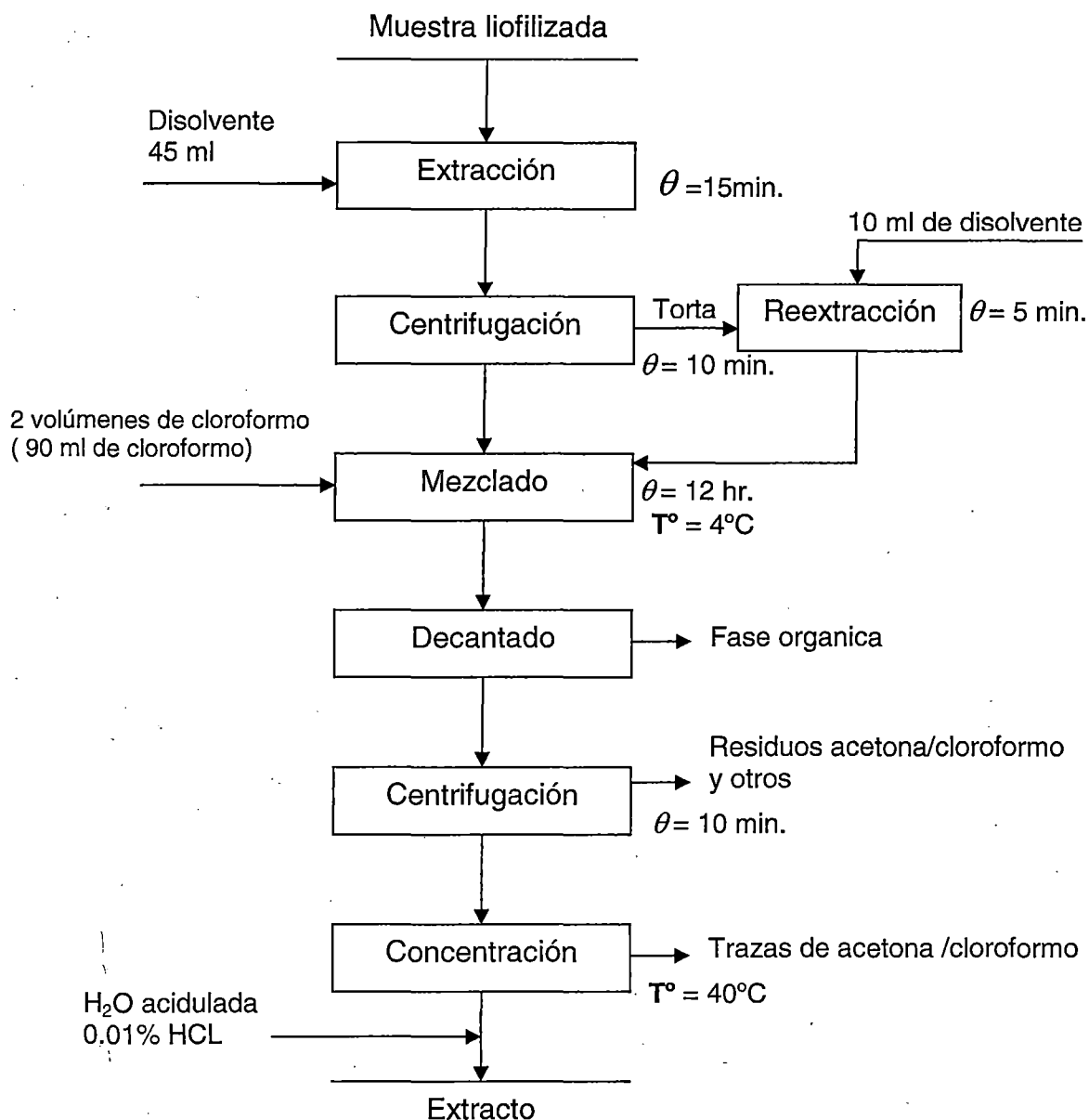
En este método, la acetona y etanol extraen las antocianinas de los clones de papa nativa liofilizada mientras el cloroformo aísla y purifica parcialmente el pigmento. La adición de cloroformo da como resultado una fase de separación

entre la fracción acuosa (contiene antocianinas, fenoles, azúcares, ácidos orgánicos y otras sustancias polares) y la fase orgánica (contiene lípidos, carotenoides, pigmentos clorofílicos y sustancias no polares), este método tiene la ventaja de producir un extracto sin contaminantes lipofílicos.

Procedimiento.

Para la extracción de antocianinas se utilizó los disolventes: mezcla acetona - agua acidificada (70.30 v/v, acidificada 0.1% HCL y 0.2% TCA) y mezcla etanol - agua acidificada (70.30 v/v, acidificada 0.1% HCL y 0.2% TCA) cada una bajo las condiciones de pH 3.0 y 4.0. Se pesó 1g de muestra liofilizada, mezclado con 45 ml del disolvente (con cada una de las mezclas indicados anteriormente) por 15 minutos con agitación continua, en baño de hielo a fin de reducir la actividad enzimática. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 4500 RPM, la torta residual fue reextraído con 10 ml del disolvente acetona - agua acidificada ó con etanol - agua acidificada durante 5 minutos. Los sobrenadantes (fase acuosa) fueron combinados respectivamente y se trasvasó a una pera de decantación, enseguida se añadió 2 volúmenes de cloroformo (de acuerdo al volumen del extracto obtenido) y se mezcló suavemente. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por 12 horas en oscuridad. La fase acuosa se separó y centrifugó por 10 minutos a 4500 RPM con el fin de eliminar el exceso de acetona/cloroformo. El sobrenadante acuoso en el que persisten trazas de acetona/cloroformo, finalmente fue eliminado usando un rotavapor Büchii a 40°C a una presión de 4000 Pa hasta obtener 5ml, se aforó a un volumen conocido (15ml) con agua acidificada (0.01% HCL). La extracción fue realizada por duplicado (Figura 10).

FIGURA 10
DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE
CLONES DE PAPA NATIVA



Fuente: Elaboración propia

2.4.4.2. Cuantificación de antocianinas

La cuantificación de las antocianinas monoméricas se determinó usando el método del pH diferencial, descrito por Giusti y Wrolstad, 2005.

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio de pH manifestado por cambios en el espectro y las absorbancias. La

forma del oxonio colorado predomina a pH 1.0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5. El método del pH diferencial se basa en los cambios de estructura, generados a dos pH diferentes lo que permite conocer la concentración y esto se mide rápidamente el total de antocianinas, incluso en pigmentos degradados, polimerizados y otros componentes interferentes.

Procedimiento.

Se determinó el factor de dilución apropiado para la mezcla. El extracto purificado se diluyó con el buffer de cloruro de potasio (0.025 M) pH = 1.0 (volumen utilizado de acuerdo con el color obtenido), para lo cual se hace un barrido de las muestras entre las longitudes de onda de 500-700nm para determinar la máxima longitud de onda y la absorbancia que no debe ser mas de 1.0, esto es que se encuentre dentro del rango lineal del espectrofotómetro. Se divide el volumen final de la muestra (18 ml) entre el volumen inicial (1ml) para obtener el factor de dilución correspondiente (en el ejm. El factor de dilución es 18). Se preparó dos diluciones de las muestras (alícuotas de 1ml del extracto purificado), una usando el buffer de cloruro de potasio (0.025 M) pH = 1.0 y la otra usando el buffer de acetato de sodio (0,4M) pH = 4.5, luego se obtiene el correspondiente factor de dilución para cada una de las muestras a ensayar. Se dejó en reposo las diluciones durante 15 minutos en oscuridad para estabilizar la mezcla. Posteriormente se midió la absorbancia de cada dilución a la máxima longitud de onda determinada respectivamente (ver Cuadro 3), usando como blanco agua destilada.

CUADRO 3: Absorbancia de las diluciones a la máxima longitud de onda.

Muestras Papas Nativas	Solvente	pH	Dilución	Experimento $A_{\lambda \text{ vis-max}}$	Del método A_{700}
Clon Azul	Acetona	3.0	1:17	522	700
Clon Rojo	Acetona	3.0	1:12	505	700
Clon Azul	Acetona	4.0	1:16	522	700
Clon Rojo	Acetona	4.0	1:11	505	700
Clon Azul	Etanol	3.0	1:13	524	700
Clon Rojo	Etanol	3.0	1:1	507	700
Clon Azul	Etanol	4.0	1:11	523	700
Clon Rojo	Etanol	4.0	1:1	531	700

Ver ANEXO 1

Se calculó la absorbancia de la muestra diluida con la siguiente fórmula:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (1)$$

En donde $A_{\lambda \text{ vis-max}}$ es la mayor absorbancia obtenida a pH 1.0 y pH 4.5, mientras que A_{700} es la lectura a 700nm tanto para pH 1.0 como pH 4.5.

El contenido de antocianinas monoméricas MAC (mg/L) fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$\text{MAC}(\text{mg/l}) = \frac{A \times DF \times PM \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (2)$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra

DF = Factor de dilución

PM = Peso molecular de la cianidina-3-glucosido (499.2 g mol^{-1})

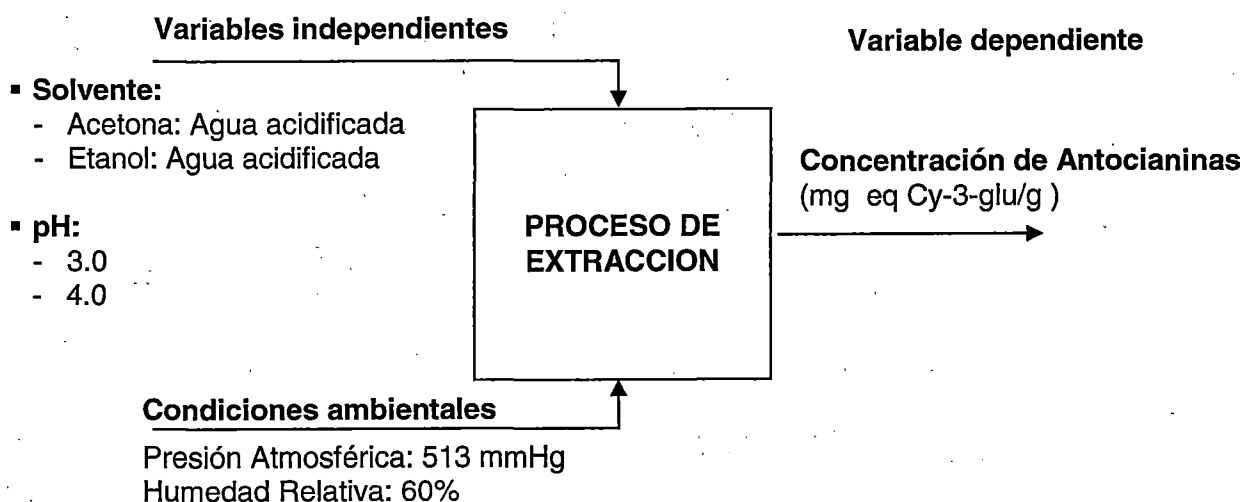
ϵ = Absortividad molar de la cianidina-3-glucosido ($26900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = Longitud del trayecto luminoso (1cm)

2.4.4.3. Diseño experimental

En el diagrama 1, se identifican las variables independientes y la variable de respuesta del proceso de extracción de antocianinas.

DIAGRAMA 1: Esquema experimental del proceso de extracción de antocianinas



El planteamiento de la hipótesis con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ es:

Hipótesis alterna:

Hi : El tipo de solvente y la variación del pH en la extracción tiene efecto significativo en el contenido de antocianinas.

Hipótesis Nula:

H0 : El tipo de solvente y la variación del pH en la extracción no tiene efecto significativo en el contenido de antocianinas.

Se acepta la hipótesis alterna si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{critico}}$ con una probabilidad menor al 0.05.

DIAGRAMA 2: ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE SOLVENTE Y pH EN LA EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS.

Materia Prima Papas Nativas	Extracción		Centrifugación	Reextracción	Mezclado	Decantado	Centrifugación	Concentración	Extracto	Cuantificación Antocianinas
	Solvente	pH								
Clon 303851	Etanol	4.0								Y ₁
	Acetona	4.0								Y ₂
Clon 304239	Etanol	3.0								Y ₃
	Acetona	3.0								Y ₄

Fuente: Elaboración propia

2.4.4.4. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente para el contenido de antocianinas, bajo un Diseño Factorial de 2^2 con arreglo en Bloques Completos Randonizados (BCR) con una confiabilidad del 95%. Para ello se utilizó el paquete estadístico: STATGRAPHICS Plus V 5.1.

2.4.5. DETERMINACIÓN DE POLIFENÓLES TOTALES

La determinación del contenido de polifenoles totales se realizó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Shaidi F. y Nacz M, 1995; Singlenton y Rossi, 1965. Se fundamenta en su carácter reductor, se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 760 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de peso seco

2.4.5.1. Extracción de polifenóles

Para la extracción de polifenóles en clones de papa nativa, se pesó 0.5g de muestra liofilizada, se le adicionó 10ml de metanol al 90% conteniendo 0.5% de ácido acético y se trituró en un mortero por 10 minutos, el homogenizado se centrifugó a 3000 RPM durante 10 minutos, el sobrenadante se guarda. El precipitado se lavo dos veces mas con la solución de metanol-ácido acético utilizando el procedimiento anterior. El sobrenadante de la primera extracción y los lavados sucesivos se concentran a presión de 13000Pa a 115 RPM a 40°C. El residuo concentrado se aforó en 50ml con metanol al 99%, para luego almacenarlo a -20°C hasta su cuantificación.

2.4.5.2. Cuantificación de polifenóles totales

Se elaboró una curva patrón utilizando ácido gálico (500ug/ml) como patrón de referencia de acuerdo al cuadro 4, se mezcló en un vortex después de cada adición. La mezcla se colocó en un baño isotérmico a 45°C durante 20 minutos, se lee la absorbancia a 760nm contra el blanco. Para determinar la concentración de los polifenóles en el extracto obtenido se utiliza la curva preparada con los patrones (ANEXO 2).

CUADRO 4: Procedimiento para la preparación de la curva patrón de polifenoles.

Nº Tubos	Ácido gálico (ug)	Ácido gálico ml	Agua ml	Na ₂ CO ₃ ml	Folin-Ciocalteu ml	Extracto ml
P1	60	0.12	0.88	2	2.5	0
P2	50	0.1	0.9	2	2.5	0
P3	40	0.08	0.92	2	2.5	0
P4	30	0.06	0.94	2	2.5	0
P5	20	0.04	0.96	2	2.5	0
P6	10	0.02	0.98	2	2.5	0
Blanco	0	0	1	2	2.5	0
Muestra1	0	0	0.5	2	2.5	0.5
Muestra2	0	0	0.5	2	2.5	0.5

2.4.6. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)

Se determina por volumetría, basado en el método descrito por Miller Dennis, 2003. El método usado fue la reducción del colorante 2,6-dicloroindofenol (DIP) por el ácido ascórbico. Al titular una solución ácida del ácido ascórbico con el DIP azul, el reactivo azul se volverá incoloro al ser reducido por el ácido ascórbico.

2.4.6.1. Preparación del extracto

Se pesó 2.5g de muestra liofilizada en un matraz erlenmeyer, se agregó 10ml de la solución de ácido oxálico a una concentración de 0.25M y macerar por 5 minutos, luego se añadió 10ml adicionales de ácido oxálico y macerar nuevamente. La mezcla macerada fue filtrada en papel whatman N°1, el filtrado se recogió en un tubo de ensayo a un volumen conocido, (20 ml). Luego se trasvaso 5ml del filtrado en un matraz, al que se agregó 10 ml de la solución ácido oxálico y 1ml HCL 1N. Se procedió a titular por duplicado.

2.4.6.2. Curva estándar para el ácido ascórbico

Se añadió la solución de ácido oxálico (9ml al 0.25M) y de ácido clorhídrico (1ml al 1N) a cada uno de los 4 matraces de 50ml. Luego se agregó la solución de ácido ascórbico (0.05mg/ml) a cada uno de los matraces, que se muestra en el cuadro 5. Se procedió a titular cada matraz con la solución del colorante (2,6 Dicloroindofenol) (0.25mg/ml), hasta que persista un color rosado ligero pero definido durante 5 seg. Se trazó una curva del volumen del colorante con relación a los miligramos de ácido ascórbico (ANEXO 3).

CUADRO 5: Procedimiento para la preparación de la curva patrón del ácido ascórbico

Nº Tubos	ácido oxálico (0.25M) (ml)	Ácido clorhídrico (1N) (ml)	Solución ácido ascórbico (0.05mg/ml) (ml)
1	9	1	0.5
2	9	1	1
3	9	1	1.5
4	9	1	2

2.4.7. DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES

Se determina cuantitativamente por el método espectrofotométrico, basado en el método descrito por Hernández y Moreno (2000).

2.4.7.1. Preparación del extracto

Se pesó 3g de muestra liofilizada, se añadió 5ml de ácido cítrico al 2% para evitar que se oxide los carotenoides y preservarlo durante 30 minutos en oscuridad. Se colocó en placas petri y dejó secar en la estufa a 40 °C hasta alcanzar peso constante para luego ser trituradas las muestras, se pesó 1g de muestra liofilizada y se añadió 35ml de la solución de hexano-éter (50:50) para lo cual se realizó la extracción en oscuridad por 48 horas.

Se separa el sobrenadante y se guarda, al precipitado se le añadió 10ml más la solución hexano-éter; se dejó que precipite y se separa la fase superior que se mezcla con el sobrenadante anterior, esto se repite hasta alcanzar 80 ml. El extracto final se concentró en rotavapor a una velocidad de 118 RPM a 40°C hasta obtener un volumen conocido (entre 3 y 5 ml), se añadió 10 ml KOH al 1% en metanol. Se separa la fase orgánica no polar, se evaluó contra el blanco hexano a una absorbancia de 440nm.

2.4.7.2. Curva estándar para el β -Caroteno

Se utiliza una solución diluida de β -caroteno (200 ug./ml.) en cada tubo de ensayo, se añadió a cada uno las cantidades de reactivos que se especifican en el cuadro 6; se agitó con cuidado los tubos y se determinó la absorbancia de cada solución a la longitud de onda de 440nm. Se procedió a construir la curva de calibración trazando un gráfico de la absorbancia vs la concentración de β -caroteno, contenida en cada una de las soluciones patrón (ANEXO 4).

CUADRO 6: Procedimiento para la preparación de la curva patrón β -Caroteno.

N° Tubos	Solución β -Caroteno (ml)	Hexano (ml)
1	0.5	9.5
2	1	9
3	2	8
4	3	7

2.4.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Se empleó el método desarrollado por Brand-Williams *et al.*, (1995). El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), consiste en que este radical tiene un electrón desapareado que presenta una coloración azul-violeta en medio metanólico, decolorándose hacia amarillo pálido como consecuencia de la donación de un electrón por un compuesto con poder antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

2.4.8.1. Preparación del extracto

Para las muestras de clones de papa nativa, se pesó 3g de muestra liofilizada, se le adicionó 20 ml de metanol al 90% y se trituró en un mortero durante 15 minutos; el extracto se almacenó durante 24 horas a 4°C en oscuridad, luego se procedió a centrifugar el homogenizado a 3500 RPM durante 15 minutos, se separa el sobrenadante y el precipitado se lavó con 20 ml de metanol, se centrifuga en las mismas condiciones anteriores y el precipitado fue eliminado. El sobrenadante de la extracción y el lavado se concentró a presión reducida a 115 RPM a 40°C, hasta obtener un volumen de 10 ml, seguidamente el concentrado se conserva en refrigeración a 4°C hasta la realización de la prueba de actividad antioxidante.

2.4.8.2. Determinación del tiempo de inhibición del 50%

Se introduce en la cubeta del espectrofotómetro 2 ml de disolución de DPPH (0.1mM). Se añade un volumen 25ul y 100ul del extracto del clon azul y rojo respectivamente, obtenidos anteriormente (2.4.8.1) y se realizó medidas de absorbancia a 517 nm cada 2 minutos durante 30 minutos.

La capacidad de atrapar radicales libres, se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_0 - A_m}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

A_0 = Absorbancia inicial del DPPH sin muestra

A_m = Absorbancia de la muestra (DPPH + extracto)

2.4.8.3. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de DPPH (CI50%) del extracto.

Se prepara una solución de DPPH a 50uM (2mg de DPPH en 100 ml de metanol) y una solución buffer de acetato de sodio a pH 6.0 (2g en 100ml de agua destilada).

Se prepara duplicados de un número de tubos de acuerdo al número de concentraciones a evaluar, que contiene los extractos según se indica en el cuadro 7. Dado que el color de la papa puede interferir con la lectura se prepara un blanco de muestra (Ver Cuadro 8) para cada uno de los tubos. Los reactivos se mezclan de acuerdo al cuadro 7 y agitando vigorosamente en un vortex por 10 segundos. Los tubos se mantienen en oscuridad durante 30 minutos y se lee la absorbancia 517nm contra el blanco.

.0

El extracto que se utilizó corresponde al tratamiento de la muestra del punto 2.4.8.1.

CUADRO 7: Determinación de la inhibición del radical DPPH – Procedimiento para la preparación de muestras

N° Tubos	Clon Azul			Clon Rojo			Amortiguador (ml)	DPPH (ml)
	Extracto		Metanol (ml)	Extracto		Metanol (ml)		
	(ug)	(ml)		(ug)	(ml)		(ml)	
P1	116	0.01	1.49	315	0.09	1.41	1	0.5
P2	232	0.02	1.48	350	0.1	1.4	1	0.5
P3	290	0.025	1.475	525	0.15	1.35	1	0.5
P4	348	0.03	1.47	612.5	0.175	1.325	1	0.5
P5	464	0.04	1.46	700	0.2	1.3	1	0.5
Blanco	0	0	2	0	0	2	1	0.0
Control	0	0	1.5	0	0	1.5	1	0.5

CUADRO 8: Determinación de la inhibición del radical DPPH – Procedimiento para la preparación del blanco de muestras

N° Tubos	Clon Azul		Clon Rojo		Amortiguador (ml)	DPPH (ml)
	Extracto (ml)	Metanol (ml)	Extracto (ml)	Metanol (ml)		
P1	0.01	1.99	0.09	1.91	1	0.0
P2	0.02	1.98	0.1	1.9	1	0.0
P3	0.025	1.975	0.15	1.85	1	0.0
P4	0.03	1.97	0.175	1.825	1	0.0
P5	0.04	1.96	0.2	1.8	1	0.0
Blanco	0	2	0	2	1	0.0

Posteriormente, con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el % de captación de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad Antioxidante} = [1 - (A2 - A3) / A1] \times 100 \quad (4)$$

% Captación de Radical Libre

Donde:

A1 = Absorbancia del patrón de referencia

A2 = Absorbancia de la muestra

A3 = Absorbancia del blanco de muestra

Nota: Para obtener los ug de extracto, previamente se llevo a sequedad un volumen conocido del extracto obtenido del tratamiento de la muestra (Ver ANEXO 5: cuadro 5.1 y cuadro 5.2)

2.4.8.4. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de DPPH (CI50%) del ácido ascórbico.

Se prepara una solución de ácido ascórbico en metanol a una concentración de 100ug/ml (5mg de ácido ascórbico en 50 ml de metanol). Seguidamente se tomaron triplicados de un número de tubos de acuerdo al número de concentraciones a evaluar según se indica en el cuadro 9, se coloca cada tubo en un vortex durante 15 segundos. Los tubos se mantuvieron en oscuridad durante 15 minutos, se lee las absorbancias a 517nm contra el blanco en un espectrofotómetro.

CUADRO 9: Determinación de la inhibición del radical DPPH frente al ácido ascórbico.

N° Tubos	à ascórbico (ug)	à ascórbico (ml)	Metanol (ml)	Amortiguador (ml)	DPPH (ml)
P1	0.5	0.005	1.495	1	0.5
P2	1	0.01	1.49	1	0.5
P3	2	0.02	1.48	1	0.5
P4	3	0.03	1.47	1	0.5
P5	4	0.04	1.46	1	0.5
P6	5	0.05	1.45	1	0.5
Blanco	0	0	2	1	0
Control	0	0	1.5	1	0.5

A continuación, con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el % de captación de radicales libres (DPPH) utilizando la fórmula (4) (Ver ANEXO 5, cuadro 5.3).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. DEL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

El cuadro 10 se muestra los resultados del análisis químico proximal de clones de papas nativas y en el anexo 6 se presenta los resultados de la muestra liofilizada.

CUADRO 10: Análisis químico proximal en dos clones de papa nativa

Componentes	% (Base seca)		% (Base húmeda)	
	Clon 303851 (Rojo)	Clon 304239 (Azul)	Clon 303851 (Rojo)	Clon 304239 (Azul)
Humedad	-	-	74.8	69.08
Materia Seca	-	-	25.2	30.92
Proteína	6.02	4.91	1.52	1.52
Grasa	1.47	1.49	0.37	0.46
Ceniza	4.04	3.89	1.02	1.2
Carbohidratos	88.47	89.71	22.29	27.74
Fibra	3.35	3.64		
Almidón	83.20	80.60		
Azúcares Reductores	0.52	0.31		

La humedad presente en las plantas y en los tubérculos depende del medio ambiente (Peña *et al.*, 2006), mientras Andre *et al.*, (2007) reporta que la humedad de variedades de papas nativas se encuentra en 65.0 a 79.4%, lo que coincide con los resultados del presente trabajo.

En lo referente a la materia seca se observa que el valor encontrado está dentro de lo reportado por Huamán, (1986) y Bonierbale *et al.*, (2004) quienes indican valores de 24-31% y 18-22% respectivamente. El contenido de materia seca en las variedades nativas es superior a 24.30% (Peña *et al.*, 2006).

Probablemente uno de los componentes nutricionales que más llama la atención en papas mejoradas y otros tubérculos, es el contenido de proteína, debido al alto valor nutritivo que radica en los altos niveles de aminoácidos esenciales como lisina, treonina, metionina y triptófano (Jaspreet y Lovedeep, 2009).

Todas las variedades de papas nativas no son considerados como una importante fuente de lípidos, ya que el contenido de estos en el tubérculo es muy baja, en cuanto al contenido de cenizas son medianamente apreciables debido a que en su composición predominan minerales como potasio, hierro, calcio y otros (Andre *et al.*, 2007).

El porcentaje de carbohidratos es abundante, como era de esperar y por lo que su utilización como fuente de energía es apreciable, por otro lado se observa que se encuentra entre valores de 88.47 – 89.71% que coinciden con lo reportado por Villacrés *et al.*, (2010), como también Peña *et al.*, (2006) encontraron valores de 21.57% a 27.23% en materia fresca. Las diversas variedades de papa nativa, difieren en el contenido de azúcares en los tubérculos, como en el contenido de N total, proteínas y aminoácidos. La gran variabilidad en el contenido de azúcares reductores, presentes en estas variedades permite identificar materiales con niveles muy bajos y estables en contenido de glucosa y fructosa, son productos de excelente color y sabor (Bonierbale *et al.*, 2004).

3.2. DE LA EVALUACIÓN MICROSCOPICA DEL LIOFILIZADO DE CLONES DE PAPAS NATIVAS

La figura 11, muestra las microfotografías de los gránulos de almidón de papa de pulpa azul y roja, obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observó la forma y tamaño de los gránulos de almidón y su asociación con otros componentes, entre ellos los pigmentos. Las flechas coloreadas señalan las formas típicas ovoides y esféricas de la superficie lisa, con fracturas y roturas de los gránulos de almidón de papa, estas observaciones coinciden con lo reportado en la literatura (Alvis, *et al.*, 2008) y las flechas blancas señalan como esta adherido el pigmento con relación al almidón, lo que dificulta la extracción de los pigmentos.

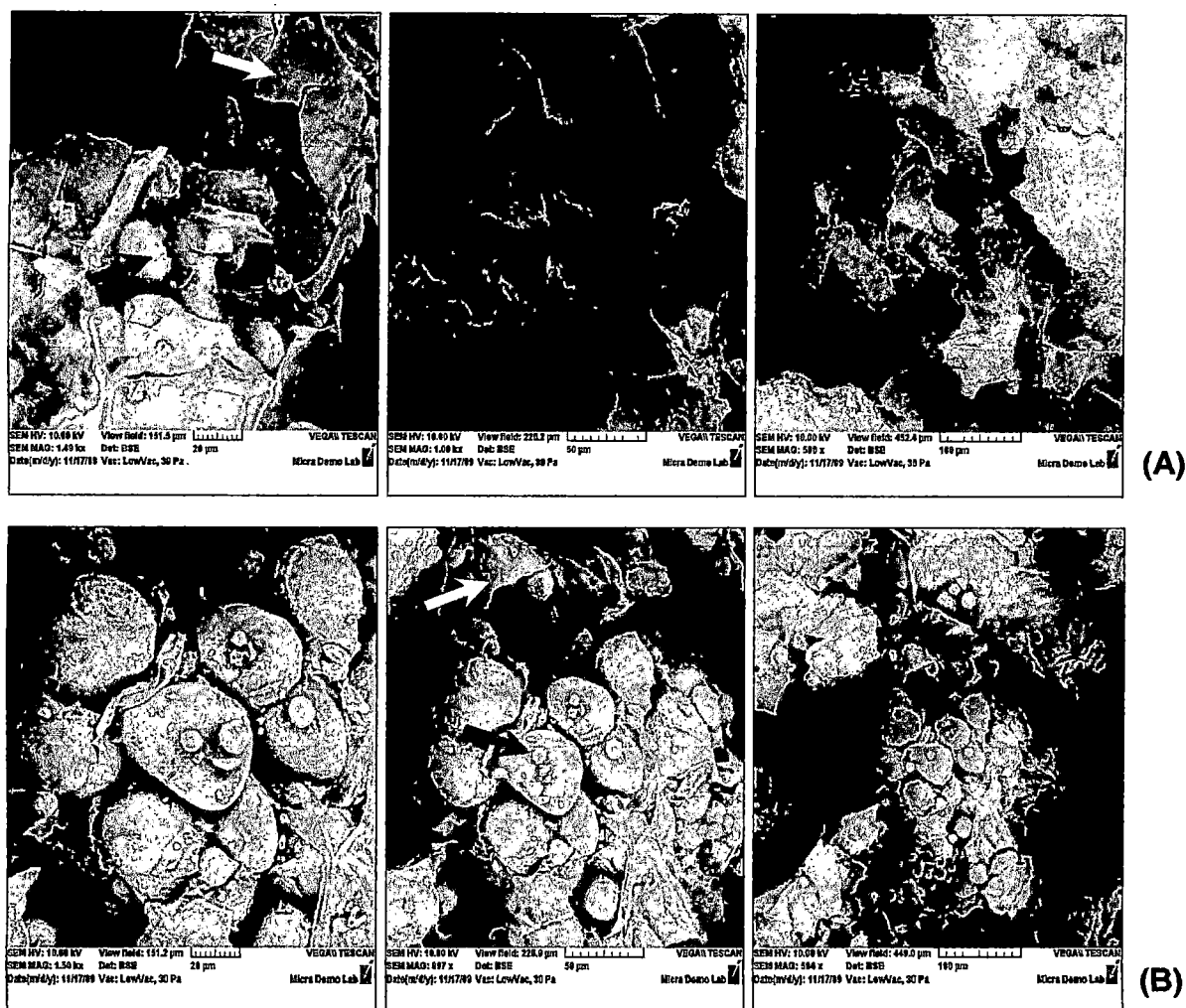


Figura 11. Microfotografías 1.5kx, 1.0kx y 500x, de almidón de papa pigmentada: Clon azul (A) Y Clon rojo (B).

3.3. DE LA INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS

La idea principal de esta etapa fue probar cual era el mejor solvente y pH para la extracción de antocianinas, tomando en cuenta que los solventes polares extraen compuestos polares y los solventes orgánicos extraen compuestos no polares, con pocas excepciones.

Después de la extracción, purificación parcial de las antocianinas y cuantificación por el método de pH diferencial, a los resultados obtenidos para cada uno de los solventes y pH se les hizo un análisis de varianza (ANOVA) para saber si existe diferencia significativa o no entre las diferentes combinaciones realizadas (Ver ANEXO 7).

3.3.1. Análisis de datos para el contenido de antocianinas en el clon 304239 (Azul)

La concentración de antocianinas totales se expresa en miligramos de cianidina 3-glucósido por gramo de muestra seca, donde los valores alcanzados en este experimento varían entre 1.6895 y 2.6272 mg cianidina 3-glucósido/g de muestra seca (Ver Cuadro 11).

CUADRO 11: Análisis de Varianza para el Clon 304239

Fuente	SC	Gl	CM	F-Ratio	P-Valor
A:Solvente	0.703595	1	0.703595	1326.20	0.0000
B:pH	0.192914	1	0.192914	363.62	0.0003
AB	0.0515366	1	0.0515366	97.14	0.0022
Bloques	0.0011544	1	0.0011544	2.18	0.2366
Error Total	0.0015916	3	0.000530535		
Total (corr.)	0.950791	7			

R-cuadrado = 99.8326 por ciento

R-cuadrado (adj.) = 99.7071 por ciento

Error Estándar de Est. = 0.0230333

Los resultados del análisis estadístico realizado para el clon 304239 indican que existen diferencias significativas, a un α de 0.05 en el contenido de antocianinas entre los dos solventes y pH, así como también en la interacción entre las dos variables. El estadístico R-sq indica que el modelo así ajustado explica el 99.83% de la variabilidad en el contenido de antocianinas.

Se observa que el efecto en la variación del solvente y pH de extracción, son significativos ($p \leq 0,05$) al 100% y 99.97% respectivamente; esto implica una alta relación causa efecto entre el contenido de antocianinas totales con la variable solvente y pH.

3.3.2. Análisis de datos para el contenido de antocianinas en el clon 303851 (Rojo)

Al aplicar las distintas condiciones de extracción, el contenido de antocianinas totales varió entre 0,0224 y 0.7206 mg cianidina 3-glucósido/ g de muestra seca (Cuadro 12).

Cabe destacar que la pigmentación del clon 303851 es menos intensa que el clon 304239, presentando a su vez una menor concentración de antocianinas.

CUADRO 12: Análisis de Varianza para el Clon 303851

Fuente	SC	Gl	CM	F-Ratio	P-Valor
A:Solvente	0.807784	1	0.807784	568.14	0.0002
B:pH	0.000145351	1	0.000145351	0.10	0.7701
AB	0.0000485113	1	0.0000485113	0.03	0.8652
Bloques	0.00134421	1	0.00134421	0.95	0.4026
Error Total	0.00426538	3	0.00142179		
Total (corr.)	0.813588	7			

R-cuadrado = 99.4757 por ciento

R-cuadrado (adj.) = 99.0825 por ciento

Error Estándar de Est. = 0.0377067

Los resultados del análisis estadístico realizado para el clon 303851 indican que existen diferencias significativas, a un α de 0.05 en el contenido de antocianinas entre los dos solventes y no así entre los pH y la interacción entre solvente - pH. El estadístico R-sq indica que el modelo así ajustado explica el 99.47% de la variabilidad en el contenido de antocianinas.

Se observa que la variable solvente influye significativamente con una probabilidad del 99.98% en el contenido de antocianinas totales del clon 303851, sin embargo la variación de pH solo influye con una probabilidad del 23%. La influencia del tipo de solvente sobre la respuesta es superior a la influencia de la variación del pH indicado.

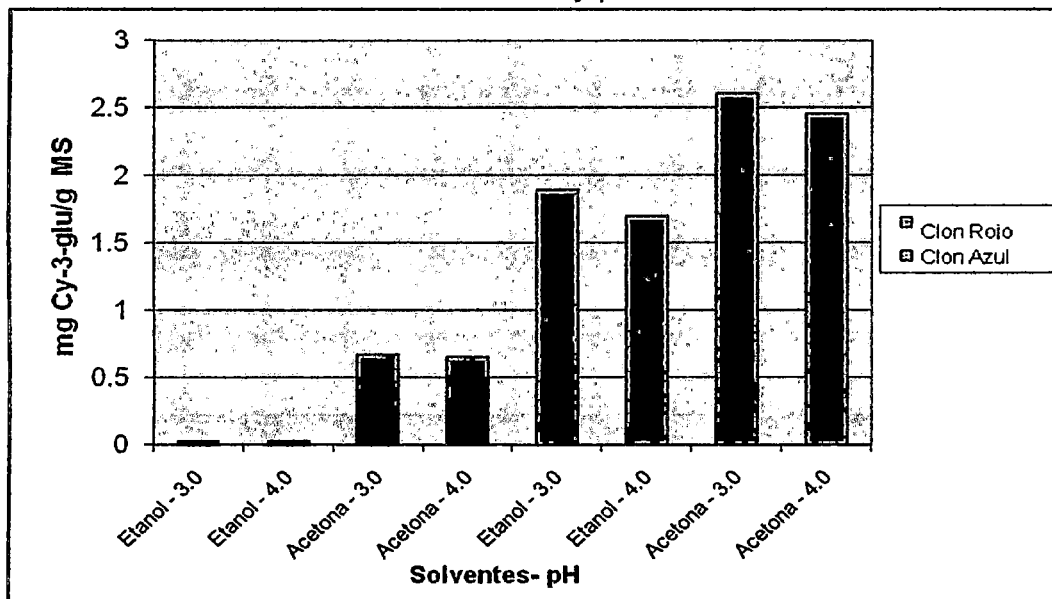
En el anexo 8, se contrasta gráficamente los resultados obtenidos para ambos clones de papa nativa.

La extracción es influenciada por la naturaleza química de los compuestos, el método de extracción empleado (extracción por solventes, la extracción en fase sólida y la extracción supercrítica), el tiempo y condiciones de almacenamiento, y la presencia de sustancias interferentes. La extracción por solventes es un proceso diseñado para separar compuestos solubles por la difusión de un sólido (tejido de la planta) usando una matriz líquida (disolvente) (Brown, 2005).

El contenido de antocianinas varió de acuerdo al solvente utilizado, la mayor eficiencia de los solventes estudiados en la extracción de los tubérculos de papa fue la acetona con respecto al etanol. Estos resultados están de acuerdo con un estudio previo de información que los solventes con polaridad alta, como el etanol no da buenos resultados de extracción. En este estudio se demuestra que la acetona es el solvente más eficiente en la extracción de antocianinas (Figura 12).

Nota: Los resultados están de acuerdo con la estadística, análisis del experimento y bibliografía.

Figura 12. Contenido de antocianinas presentes en los dos clones de papa nativa a diferentes solventes y pH.



El uso del agua en combinación con otros solventes orgánicos (acetona) contribuye a la creación de un medio moderadamente polar que garantiza la

extracción de antocianinas (Chirinos *et. al.*, 2006). El efecto del pH en la extracción se evaluó con un 0.1% de HCl para aumentar la estabilidad, mejorar la desintegración de las paredes celulares, lo que facilita la solubilidad y la difusión de las antocianinas, y sobre todo para inhibir la actividad de la polifenoloxidasas presentes en los tubérculos de papa; sin embargo se observó una disminución en la recuperación de los compuestos antocianicos de los clones de papa nativa cuando el valor del pH del solvente fue superior a 3.0.

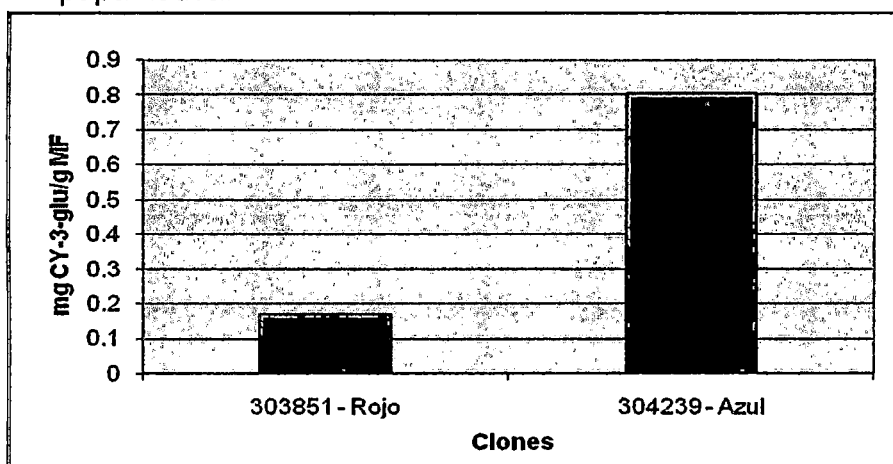
3.4. CONTENIDO DE ANTOCIANINAS TOTALES

Los resultados del contenido de antocianinas de las papas nativas: clon 303851 y clon 304239 se detallan en el cuadro 13 y se muestra en la figura 13, expresados en mg de cianidina-3-glucósido/g.

Cuadro 13: Contenido de antocianinas totales en dos clones de papa nativa.

Muestras	Antocianinas Totales		
	mg Cy-3-glu/ g MS	mg Cy-3-glu/ g MF	mg Cy-3-glu/ 100g MF
303851 (Clon Rojo)	0.6677	0.1683	16.83
304239 (Clon Azul)	2.6015	0.8044	80.44

Figura 13: Contenido de antocianinas totales presentes en los dos clones de papa nativa.



Como se aprecia en el cuadro 13, la concentración de antocianinas de los dos clones de papa nativa difieren significativamente, clon 304239 es la que presenta la mayor concentración de antocianinas (80.44 mg/100g MF) con respecto al clon 303851 (16.83 mg/100g MF).

Segura (2004), afirma que los genotipos de papas nativas con pigmentación morada presentan mayores concentraciones de antocianinas, con valores de 79,89 y 58,76 mg cianidin-3-glucósido/100g MF, sin embargo, Rodríguez-Saona *et al.*, (2001), mencionan que las papas con pigmentación roja presentan un alto contenido de antocianinas, en comparación a aquellas con pigmentación morada.

El cuadro 14 muestra una comparación del contenido de antocianinas reportado por diversos autores y los resultados obtenidos en la presente investigación. El clon 304239 se encontró dentro de los rangos reportados por los cinco autores, mientras que el clon 303851 se encontró dentro de los rangos reportados por Rodríguez-Saona *et al.*, (1998) y Brown *et al.*, (2003).

Los resultados obtenidos y en contraste con la bibliografía afirman que la concentración de antocianinas dependen de factores como: la naturaleza, variedad, el método de extracción y cuantificación de antocianinas, también la expresión de los resultados ya que varían en función al tipo de antocianidina presente.

Cuadro 14. Concentración de antocianinas de papas moradas y rojas expresados en (mg de cianidina-3-glucósido/100g MF).

Característica del tubérculo	Valor	Autor y año
Clon 303851 (Rojo)	16.83	Resultados de la presente investigación (2010)
Clon 304239 (Azul)	80.44	
Papas con pulpa morada (<i>Solanum sp</i>)	59.0-80.0	Campos <i>et al.</i> (2006)
Clones de papas nativas – Pulpa roja Pulpa morada	6.9-35	Brown <i>et al.</i> , (2003)
	5.5-17.1	
Papas con pulpa roja y morada (<i>Solanum spp</i>)	37.50	Lachman <i>et al.</i> (2008)
Patata con pulpa roja y púrpura (<i>Solanum tuberosum L.</i>)	92,50	Reyes <i>et al.</i> (2005)
Papas nativas (<i>Solanum spp</i>)	44,10	Segura (2004)
Patata roja (<i>Solanum tuberosum y Solanum stenotomun</i>)	21,00	Rodríguez-Saona <i>et al.</i> (1998)

Lewis *et al.* (1998a) citado por Brown, (2005) hallaron concentraciones mucho más altas de antocianinas en ciertos cultivares que se extiende hasta a 368 mg

por 100 g de peso fresco en papas de pulpa púrpura y hasta 22 mg/100g MF en los tipos de carne roja. Pelargonidina y peonidina se encuentran en cantidades casi iguales en las de pulpa roja, mientras que petunidina y malvidina son predominantes en la de pulpa púrpura.

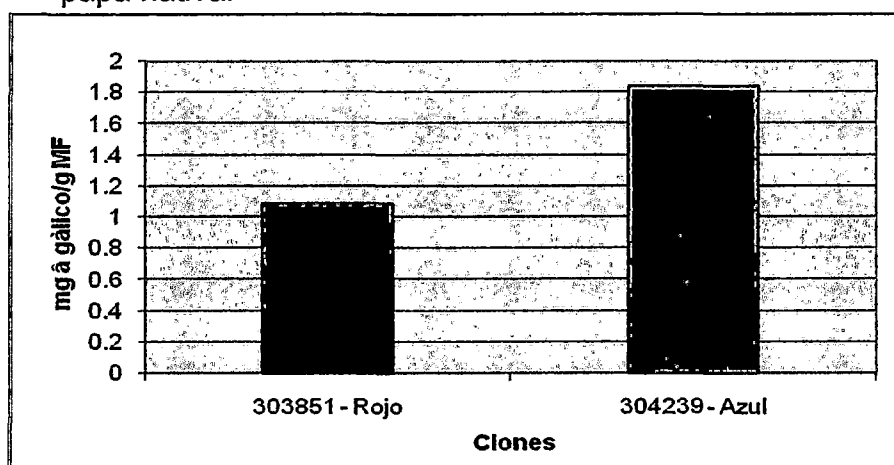
3.5. CONTENIDO DE POLIFENÓLES TOTALES

Los polifenóles es uno de los grupos principales de compuestos que se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres. Se presentan los resultados del contenido de polifenóles totales expresados en peso seco y fresco en el cuadro 15 y se grafican en la figura 14. Se puede observar un mayor contenido de polifenóles en el clon 304239 (5.938 mg ácido gálico/g MS) con respecto al clon 303851(4.283 mg ácido gálico/g MS). Los niveles obtenidos en este estudio se encuentran de acuerdo con aquellos reportados por Andre *et al.*,(2007), que están en el rango de 1.12 - 12.37 mg ácido gálico/g MS y superiores a los resultados obtenidos por Shiroma *et al.*, (2008) y Moenne-Locoz, (2008), que se encuentran entre 8.52 - 153.20 y 8.32 mg ácido gálico/100g MS respectivamente.

Cuadro 15: Contenido de polifenóles totales en dos clones de papa nativa.

Muestras	Polifenóles Totales		
	mg á gálico/ g MS	mg á gálico/ g MF	mg á gálico/100 g MS
303851 (Clon Rojo)	4.293	1.082	429.3
304239 (Clon Azul)	5.938	1.836	593.8

Figura 14: Contenido de polifenóles totales presentes en los dos clones de papa nativa.



Según los resultados obtenidos por Lachman *et al.*, (2008) el contenido de polifenoles totales son causados principalmente por antocianinas. Las antocianinas principales encontrados en papas son glucósidos diversos de pelargonidina, petunidina y malvidina (Lewis *et al.*, 1998a citado por Lachman *et al.*, 2008), asimismo entre mas intenso es el color rojo o morado de la piel o pulpa, los genotipos presentan mayor contenido de polifenoles (Villacrés *et al.*, 2010).

También encontraron que las variedades de pulpa púrpura o rojo tenían el doble de concentración de flavonoides de las variedades de pulpa blanca y de tres a cuatro veces la concentración de los ácidos fenólicos, quienes contribuyen en el contenido de polifenoles. Por ejemplo los flavonoides en orden de abundancia fueron catequina, epicatequina, erodictyol, kaempferol y naringenina. Los ácidos fenólicos predominantes fueron el ácido clorogénico, el ácido vanílico, y el ácido p-cumárico (Lewis *et al.*, 1998b).

El genotipo y localización (condiciones ambientales) han sido observados como las fuentes de principal variación en el contenido polifenoles entre papas (Shiroma *et al.*, 2008).

3.6. CONTENIDO ÁCIDO ASCÓRBICO

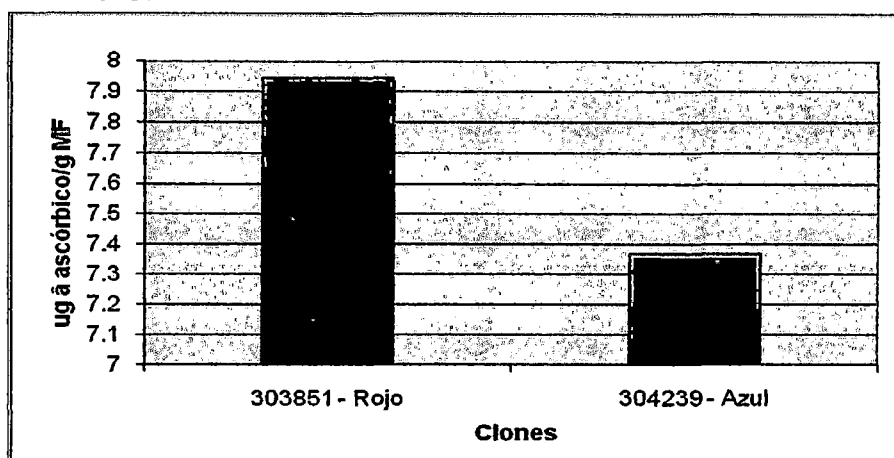
El ácido ascórbico, es un nutriente esencial en la dieta humana y es reconocido por su capacidad de reducir las reacciones de oxidación. La estabilidad del ácido ascórbico es afectada por diversas condiciones ambientales tales como temperatura, luz, oxígeno y actividad de agua (Fennema, 2000).

El contenido de ácido ascórbico en los dos clones de papa nativa estudiadas en el presente trabajo se muestra en el cuadro 16 y se grafican en la figura 15.

Cuadro16: Contenido de ácido ascórbico en dos clones de papa nativa.

Muestras	ácido ascórbico		
	ug â ascórbico/g MS	ug â ascórbico/g MF	mg â ascórbico/100g MF
303851 (Clon Rojo)	31.52	7.943	0.7943
304239 (Clon Azul)	23.84	7.371	0.7371

Figura 15: Contenido de ácido ascórbico presentes en los dos clones de papa nativa.



Se puede observar un mayor contenido de vitamina C en el clon 303851 (31.52 ug ácido ascórbico/g MS) con respecto al clon 304239 (23.84 ug ácido ascórbico/g MS).

Informes recientes de la variabilidad genética informan de una alta heredabilidad para el contenido de vitamina C ($h^2 = 0.96$), y se miden en los clones de la progenie de los cruces que constituye con 40mg de vitamina C por cada 100g de peso fresco. Se ha destacado el contenido elevado de vitamina C en especies cultivadas de *Solanum phureja*. En los cruces de *S. phureja* (diploide), con los padres tetraploide se observaron relativamente niveles altos de la vitamina C en la progenie; sin embargo en especies de *S. stenotomum* y *S. Goniocalix* los niveles de vitamina C son bajos (Brown, 2005), por lo tanto se confirman los resultados obtenidos en el presente estudio.

Dale *et al.*, (2003) también demostró la gran reducción en el contenido de vitamina C que se produce durante el almacenamiento con un promedio del 45%, se sabe relativamente poco de la contribución de la vitamina C en la papa al valor antioxidante.

Además de la disminución durante el almacenamiento ya se ha señalado, que el contenido de vitamina C aumenta durante el desarrollo del cultivo, pero disminuye durante la maduración final de la temporada de la cosecha (Brown, 2005).

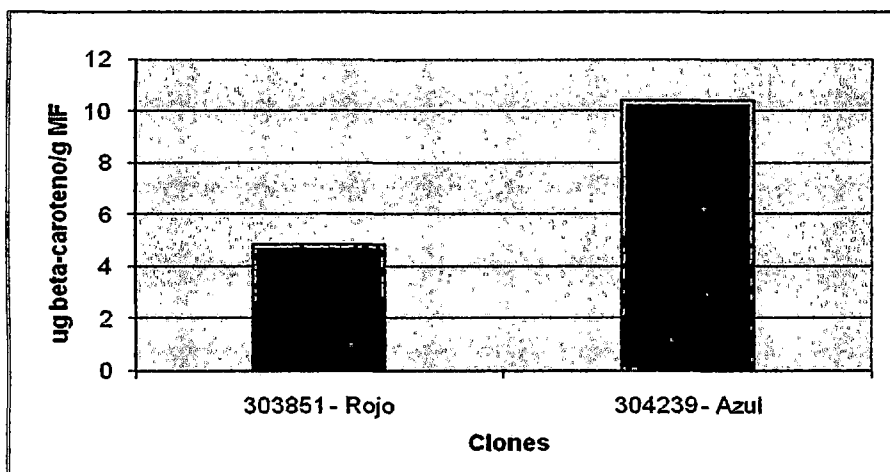
3.7. CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES

Los niveles de carotenoides totales en clones de papa nativa se presenta en el cuadro 17 y se grafican en la figura 16. Se puede observar una variación en el contenido de carotenoides totales en los dos clones; el clon 304239 mostró mayor contenido de carotenoides de 33.65 ug/g con respecto al clon 303851 que fue de 19.29 ug/g. Estos niveles de carotenoides se encuentran en el rango de valores reportado por Andre *et al.*, (2007) que obtuvieron entre 2.83 - 36.21 ug/g MS, además menciona que los carotenoides principales de la papa pigmentada son zeaxantina, antheraxantina, violaxantina, y luteína en diferentes proporciones dependiendo del genotipo y de las condiciones de almacenamiento.

Cuadro 17: Contenido de carotenoides totales en dos clones de papa nativa.

Muestras	Carotenoides Totales		
	ug β -caroteno/g MS	ug β -caroteno/g MF	ug β -caroteno/100 g MF
303851 (Clon Rojo)	19.2875	4.860	486.0
304239 (Clon Azul)	33.6507	10.405	1040.5

Figura 16. Contenido de carotenoides totales presentes en los dos clones de papa nativa.



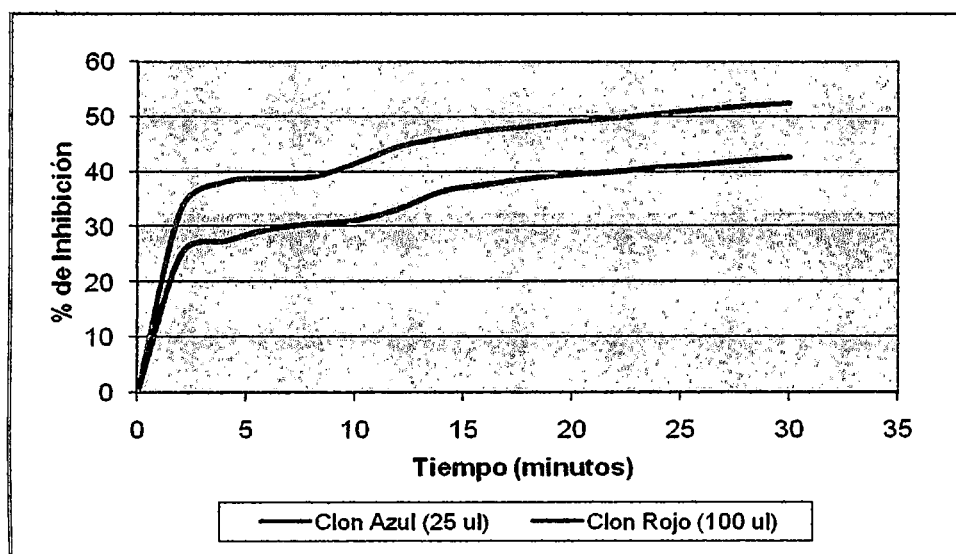
La variación elevada en el contenido de carotenoides totales se mostró entre los dos clones debido a los progenitores empleados para cada progenie, es probable en el mejoramiento se haya logrado promisoriamente un incremento de xeoantina y acumulación de β -caroteno en los tubérculos, como lo reportado por Bonierbale *et al.*, 2004.

Brown *et al.*, (1993) encontraron niveles superiores a 2000 ug en el mejoramiento de la segregación de materiales para fenotipos de pulpa naranja, amarillo, blanco procedentes de una población diploide como *S. phureja* y *S. stenotomum*. Hale, (2003) citado por Brown, (2005) encontraron un rango de 97 a 536 ug por cada 100 g de peso fresco en una serie de cultivares y líneas de mejoramiento. El contenido de carotenoides no parece estar relacionado con el color de la pulpa.

3.8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la figura 17 y anexo 9, se muestran los resultados del tiempo Vs porcentaje de inhibición del radical DPPH inhibido por las diferentes volúmenes del extracto de papa de los clones azul y rojo (25 y 100 ul respectivamente).

Figura 17: Tiempo Vs. Porcentaje de inhibición del radical DPPH inhibido por el extracto de papa del clon azul y clon rojo



Cuadro 18: Tiempo de inhibición al 50% en dos clones de papa nativa

Muestra	% inhibición	Tiempo inhibición (minutos)
304239 - Clon Azul	50.0	22.919
303851 - Clon Rojo	50.0	54.94

En el cuadro 18 se observa los resultados; el extracto clon azul presenta mayor actividad antioxidante con respecto al extracto clon rojo. Esto significa que cuando la actividad se expresa como TEC 50%, que representa el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio a la concentración inhibitoria del 50% (IC50) (Padilla *et al.*, 2008), con 25 µl del extracto azul se alcanza el TEC50% en 22.919 minutos. La mayor actividad antioxidante esta relacionada con el mayor volumen de extracto el cual contendrá mayor proporción de sustancias antioxidantes como vitamina C y polifenóles.

En las Figuras 18 y 19 se determinó la capacidad antioxidante, medida por el porcentaje de captación de radicales libres (Ver ANEXO 5), para los dos clones de papa nativa azul y rojo respectivamente a diferentes concentraciones, en las que fueron ajustados a una ecuación logarítmica. Asimismo en la Figura 20 se puede observar la capacidad antioxidante de la Vitamina C

Figura 18: Concentración del Extracto Azul Vs Porcentaje de Captación de Radicales Libres

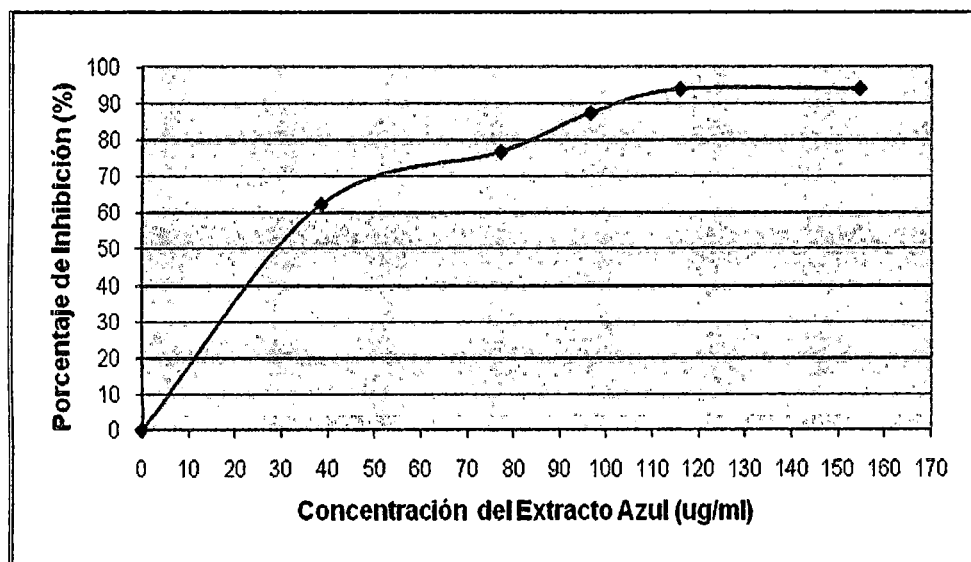


Figura 19: Concentración del Extracto Rojo Vs Porcentaje de Captación de Radicales Libres

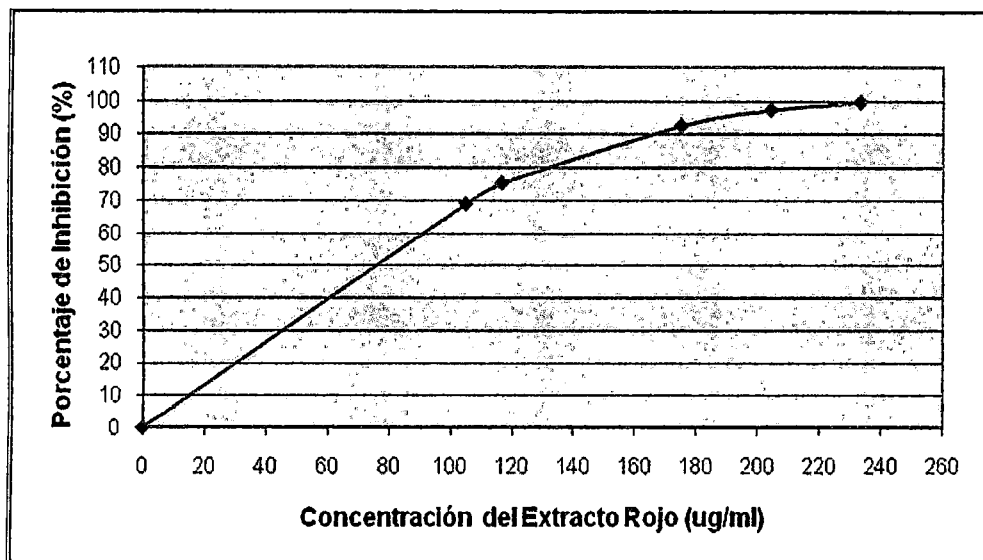
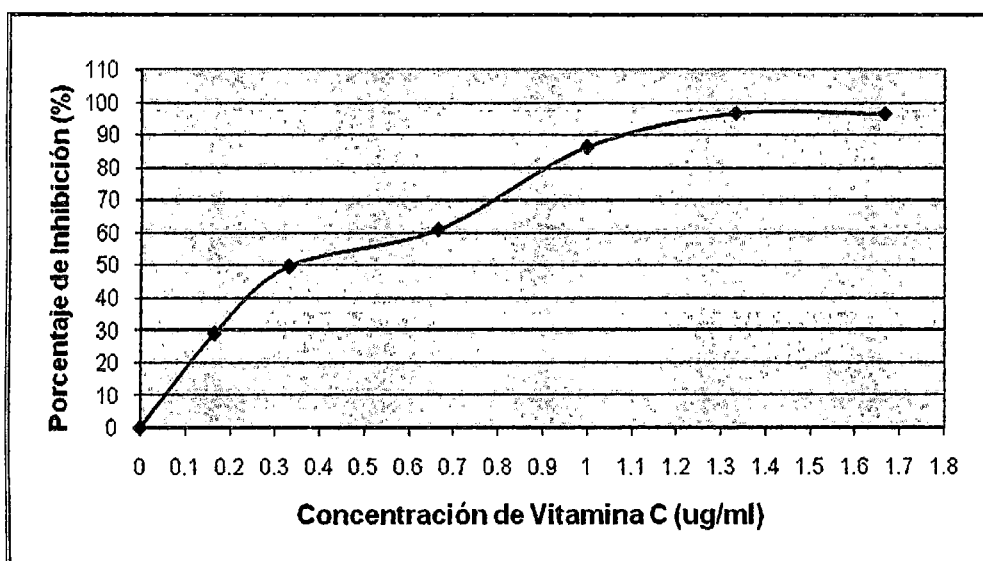


Figura 20: Concentración de Vitamina C Vs Porcentaje de Captación de Radicales Libres



En la evaluación de la actividad antioxidante frente al radical DPPH de diferentes tubérculos andinos se utilizan equivalentes trolox (antioxidante sintético) (Campos *et al.*, 2006), en el presente estudio se utilizó la Vitamina C como patrón de comparación. Se puede observar que ambos clones de papa nativa necesitan mayor concentración de vitamina C para inhibir el radical DPPH al 50%.

Cuadro 19: Capacidad Antioxidante a IC 50% de los extractos Azul, Rojo y vitamina C

IC 50	
Extractos	Concentración (ug/ml)
304239 - Clon Azul	27.52
303851 - Clon Rojo	76.15
Vitamina C	0.35

Los resultados de la capacidad antioxidante a una concentración inhibitoria del 50% (IC50%) se observa en el cuadro 19, dado que cuanto mas menor es el valor de IC50 mayor es el poder antioxidante, podemos observar que el valor de IC50 de la vitamina C es menor que los extractos azul y rojo esto se debe a que la vitamina C (â ascórbico) posee propiedades fuertemente reductoras. Tales propiedades se deben a su estructura enodiol. (Serra y Cafaro, 2007).

Cuentas *et al.*, (2008) reportaron la capacidad antioxidante de hojas de maca encontrando un valor de IC50 63.78 ug/ml, así mismo Sandoval *et al.*, (2002) reportaron la actividad antioxidante de la maca, obteniendo un IC50 de 430-610 ug/ml; comparando con estos valores el extracto clon azul y clon rojo mostró tener una mayor actividad antioxidante que los estudios mencionados.

Los compuestos funcionales responsables de esta actividad antioxidante en las papas son los ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, ácido ascórbico, carotenoides y tocoferoles (Lavanya, 2007).

Lavanya, (2007) reportó que entre antocianidinas, malvidina es el antioxidante mas potente, la cianidina mostró tres veces más antioxidantes que el potencial de pelargonidina. Varios informes indican fuerte correlación positiva entre fenóles totales y/o antocianinas y antioxidantes.

La capacidad antioxidante de la papa de variedades de pulpa roja y púrpura mostraron de 2,5 a tres veces mayor actividad antioxidante en comparación con las variedades de pulpa blanca (Brown et al., 2005).

CONCLUSIONES

- La extracción con acetona fue la más efectiva para ambos clones de papa nativa, pero el efecto de pH (3.0 – 4.0) no varió en el contenido de antocianinas para el clon 303851, sin embargo existe diferencias significativas para el clon 304239 obteniéndose un pH adecuado de 3.0. Por lo tanto la adición de agua acidificada en la extracción con solventes incrementa la estabilidad, inhibe la acción de las enzimas y mejora la desintegración de la pared celular facilitando la solubilización y la difusión de los compuestos antocianicos,
- El clon 304239 mostró mayor contenido de polifenoles (1.836 mg ácido gálico/g MF) y carotenoides (10.405 ug β -caroteno/g MF) que el clon 303851 (1.082 mg ácido gálico/g MF y 4.860 ug β -caroteno/g MF respectivamente), sin embargo se encontró mayor contenido de vitamina C en el clon 303851 (7.943 ug ácido ascórbico/g MF) con respecto al clon 304239 (7.371 ug ácido ascórbico/g MF). Estas diferencias presentes en ambas papas nativas se deben a los progenitores empleados para cada uno y a las condiciones ambientales en las que fueron cultivadas y almacenadas, ya que todo el ambiente que rodea su crecimiento y desarrollo influye en su composición.
- La actividad antioxidante del clon 304239 es mayor, porque logró un menor IC50 (27.52 ug/ml) con respecto al clon 303851 (76.15 ug/ml), el cual esta relacionada con el contenido de antocianinas y polifenoles.

Los resultados concluidos en esta tesis demuestran la potencialidad de los clones de papas nativas como fuente de alimento funcional, el cual se logro mediante el mejoramiento genético de clones selectos con características especiales: alto rendimiento, buena apariencia agronómica de los tubérculos, resistencia a virus y alto contenido de antocianinas, polifenoles, carotenoides, lo cual permitiría alcanzar nuevos mercados alternativos,

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales sobre aislamiento e identificación estructural de los principios activos presentes en estos extractos de papa nativa estudiados en el presente trabajo, que han presentado una capacidad antioxidante.
- Realizar un estudio de identificación y cuantificación de los tipos de antocianinas en los clones de papas nativas en estudio.
- Realizar un estudio sobre la aplicación de las antocianinas de papa nativa como colorante en alimentos y como producto antioxidante para alimentos como también para la salud (como extracto líquido o en polvo).

BIBLOGRAFIA

1. Alvis Armando, Vélez Carlos A., Villada Héctor S. y Rada-Mendoza Maite, (2008). Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Ñame, Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas. ISSN Vol. 19 N°1, pág.: 19-28
2. Amorós, W; Bonierbale, M. y Manrique, K, (2008).Mejoramiento genético de la papa para uso gourmet. Centro Internacional de la Papa CIP. Lima.
3. Andre M. Christelle, Ghislain Marc, Bertin Pierre, Oufir Mouhssin, Herrera Mara del Rosario, Hoffmann Lucien, Hausman Jean-Francois, Larondelle Yvan, and Evers Danile, (2007). Andean Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a Source of Antioxidant and Mineral Micronutrients. J. Agric. Food Chem., 55 (2), 366-378.
4. Avello Marcia, Suwalsky Mario, (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. pp. 161-172.
5. Bonierbale, M., Amoros W., Espinoza J., Mihovilovich E., Roca W. y Gomez R., (2004). Recursos Genéticos de la papa: don del pasado, legado para el futuro. Suplemento revista latinoamericana de la papa.
6. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C., (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.Wiss. Technol 22, 25-30.
7. Breithaupt DE, Bamedi A., (2002). Carotenoids and carotenoid esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.): New insights into an ancient vegetable. J. Agr. and Food Chem. 50, 7175-7181.
8. Brown C. R., (2005). Antioxidants in Potato. Amer J of Potato Res 82:163-172.
9. Brown C. R., R. Wrolstad, R. Durst, C. P. Yang, and B. Clevidence,(2003). Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins. Amer. J. Potato Res. 80:241-250 Brush SB (1991). Farmer conservation of New World crops: the case of Andean potatoes. Diversity, 7:75-79.
10. Brown CR, CG Edwards, C-P Yang, and BB Dean. 1993. Orange flesh trait in potato: Inheritance and carotenoid content. J Amer Soc Hort Sci 118:145-150.

11. Campos David, Noratto Giuliana, Chirinos Rosana, Arbizu Carlos, Roca Willian and Cisneros-Zevallos Luis, (2006). Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1481–1488.
12. Cevallos Casals B.A. y Cisneros Zeballos L, (2004). Stability of Anthocyaninbased Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chem.*86:69-77.
13. Chirinos Rosana, Rogez Hervé, Campos David, Pedreschi Romina, Larondelle Yvan, (2006). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ru'iz & Pav'ón) tubers. *Elsevier B.V.*55,217-225.
14. Cuentas, R; De la Cruz, L; Hernández, G; Mateo, L; Castañeda, C; Ibañez, L; Ramos E., (2008). Evaluación del efecto antioxidante de hojas de *Lipidium peruvianum* Chacon, "Maca"
15. Cuevas Montilla E., Antezana A. y Winterhalter P., (2008). Analisis y caracterización de antocianinas de diferentes variedades de maiz (*Zea mays*) Boliviano. cartagena
16. Dale MFB, DW Griffiths, and DT Todd. 2003. Effects of genotype, environment, and postharvest storage on the total ascorbate content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *J Agric Food Chem* 51:244-248
17. Durst R, Wrolstad RE, (2001). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons; p. 33-45.
18. Eichhorn S., Winterhalter P., (2005). Anthocyanins From Pigmented Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties. Institute of Food Chemistry, Technical University of Braunschweig, Schleinitzstr. 20, 38106. Braunschweig, Germany. *Food Research International* 38. 943–948.
19. Fennema Owen R., (2000). *Química de los alimentos*, Editorial Acribia S.A Zaragoza - España.

20. Garzón Gloria Astrid, (2008). Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. A Review. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
21. Garzón GA, Wrolstad RE, (2001). The Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins at Varying Water Activity. *Food Chem.*;75:185-96.
22. Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C, (1998). Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine. *J Agric Food Chem.*46 (2), 361-367.
23. Giusti, M.M. y Wrolstad, R.E., (2005). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Unit F1.2. In *Handbook of Food Analytical Chemistry*. R.E. Wrolstad, S.J. Schwartz (Ed.). John Wiley y Sons, Inc. New York, NY. Pp. 19-31.
24. Gomez, R. y Wong, D., (2008). Procesamiento de la papa. *Revista Agroecológica INDOAGRO (Lima)*, 1: 24p.
25. Gordon M.H, (1990). The mechanism of antioxidant action in vivo. *Food Antioxidants*, Elsevier, London, 1-18.
26. Hagiwara A, Yoshino H, Ichiharam T, Kawabe M, Tamano S, Aoki H, (2002). Prevention by Natural Food Anthocyanins, Purple Sweet Potato Color and Red Cabbage Color, of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-B]Pyridine(Phip)-Associated Colorectal Carcinogenesis in Rats. *J Toxicol Sci.*;27:57-68.
27. Hale A.L., (2003). Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. PhD dissertation, Texas A&M University, College Station, TX.
28. Hawkes, J.G., (1990). The potato-evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, Oxford, UK.
29. Hernández, G.; Moreno Alvarez, M. J., (2000). Efecto del secado y del ácido cítrico sobre la degradación de los carotenoides de tamarillo (*Cyphomandra betacea* Sendt). *Ciencia Tecnología de Alimentos*. Vol. 2, No. 5, pp. 228-233.
30. Hijmans, R., D.M. Spooner, A.R. Salas, L. Guarino, J. de la Cruz, (2002). Atlas of wild potatoes. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop*

Genepools. No. 10. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome (Italy). 130 p.

31. Hoshino T, Matsumoto U, Goto T, Harada N, (1982). Evidence for the self-association of anthocyanins in neutral aqueous solution. *Tetrahedron Lett.*;23:433.
32. Huamán, Z., (1986). *Botánica sistemática y morfología de la papa*. (Lima), Bol. 06. CIP, 23p.
33. Jaspreet Singh y Lovedeep Kaur, (2009). *Advances in potato chemistry and technology*. 2a. ed. Editorial Elsevier – USA.
34. Jin Ming Kong, Lian Sai Chia, (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *J Phytochemistry* 64, 923 – 933, Pergamon.
35. Kuskoskil E. Marta, Asuero Agustín G., Troncoso Ana M., Mancinil-Filho Jorge, Fett Roseane, (2005). Aplicación de Diversos Métodos Químicos para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. *Ciencia Tecnología Alimentos*. Campinas, 25(4): 726-732.
36. Lachman Jaromir, Hamouz Karel, (2005). Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition. *Plant soil environ*, 51, (11): 477-482.
37. Lachman, J., K. Hamouz, M. Orsak, and V. Pivec, (2001). Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and nutrition. *Rost. Vyroba*. 47: 181-1912.
38. Lachman Jaromír, Hamouz Karel, Sulc Miloslav, Orsák Matyáš, Pivec Vladimír, Hejtmánková Alena, Dvorák Petr, Cepl Jaroslav, (2008). Cultivar Differences of Total Anthocyanins And Anthocyanidins In Red And Purple-Fleshed Potatoes And Their Relation To Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, doi:10.1016.
39. Leighton Puga Federico, Urquiaga Reus Inés, Casanegra Prnjat Pablo, Inestrosa Cantin Nibaldo, Maiz Gurruchaga Alberto, (1998). *Boletín ciencia, vino y salud, programa bases moleculares de las enfermedades crónicas*. Facultad de Ciencias Biológicas - Pontificia Universidad Católica de Chile. Vol. 2 N° 2.
40. Leighton Puga Federico, Urquiaga Reus Inés, Casanegra Prnjat Pablo, Inestrosa Cantin Nibaldo, Maiz Gurruchaga Alberto, (1999). *Boletín ciencia, vino y salud, programa bases moleculares de las enfermedades crónicas*.

Facultad de Ciencias Biológicas - Pontificia Universidad Católica de Chile.
Vol. 3 N° 2.

41. Lewis E. Christine, Walker R. L. John, Lancaster E. Jane and Sutton H. Kevin, (1997). Determination of Anthocyanins, Flavonoids and Phenolic Acids in Potatoes. I: Coloured Cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J Sci Food Agric*, 77, 45-57.
42. Lewis C.E., Walker J.R.L., Lancaster J.E., Conner A.J., (1998)a. Light regulation of anthocyanin, flavonoid and phenolic acid biosynthesis in potato minitubers *in vitro*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25: 915–922.
43. Lewis, C.; Walker, J.; Lancaster, J.; Sutton, K., (1998)b. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food Agric.*, 77, 45-57.
44. Lock de Ugaz Olga, (1990). Colorantes naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú.
45. Lu W, Haynes K, Wiley, E and Clevidence B., (2001). Carotenoid content and color in diploid potatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 722-726.
46. Martínez Velarde Isabel, Periago María Jesús, Ros Gaspar, (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Unidad Docente de Bromatología e Inspección de Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Volumen 50, N°1.
47. Miller Dennis, (2003). Química de los alimentos - Manual de laboratorio. Editorial Limaza - Mexico.
48. Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K, (1999). Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin- 3,5-Diglucoside, Into Rats and Humans. *J Agric Food Chem.*47:1083-1091.
49. Olaya C.M., Castaño M.P., Garzón G.A., (2008). Effect of Temperature and Water Activity on the Stability of Microencapsulated Anthocyanins Extracted From Andes Berry (*Rubus glaucus*) and Tamarillo (*Solanum betaceum*).
50. Padilla F., Rincón A., Bou Rached L., (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol.N° 58, N° 3.

51. Palomino L., (2008). Posibilidades Agroindustriales de las papas nativas. Instituto Nacional de Investigación Agraria–INIA–Cusco.
52. Peña G., Tenorio M., Vila P., Cortez R., Hermosa E., Miranda Y., Barrantes F., Riveros H. Y Castro T., (2006). Caracterización morfológica, citogénica y molecular de germoplasma de papas nativas de la Provincia de La Mar-Ayacucho. Instituto de Investigación en Ciencias Biológicas.
53. Pérez Trueba, Gilberto, (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. Centro de Investigación Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Revista Cubana : 22(1): 48-57.
54. Prior R.L., Wu X., Schaich K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric Food Chem. 53:4290- 4302.
55. Reyes, L.F., L. Cisneros - Zevallos, J.C. Millar, (2003). Red/purple-flesh potatoes: A potential source on natural colorants and antioxidants for the food industry. Am. Potato J. 80:75.
56. Rodríguez-Saona, L.; Giusti, M. y Wrolstad, R., (1998). Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. J. Food Sci. 63: 458-465.
57. Rodríguez-Saona, L. y Wrolstad, R., (2001). Extraction, Isolation and Purification of Anthocyanins. In "Current Protocols in Food Analytical Chemistry". John Wiley and Sons. pp. 1.
58. Rojano Benjamín A., A. Gaviria Carlos, A. Gil Maritza, A. Saez Jairo, Schinella Guillermo, Tournier Horacio, (2008). Antioxidant Activity of the Isoespintanol in Different Media. Universidad de Antioquia, Medellín – Colombia. ISSN 0121-4004 Vol. 15 N° 1. pág. 173-181.
59. Romer S, Lubeck J, Kauder F, Steiger S, Adomat C, Sandmann G.,(2002). Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. Metabolic Engineering 4, 263-272.
60. Salas, A.R., D.M. Spooner, Z. Huamán, R.V.T. Maita, R. Hoekstra, K. Schuler, R.J. Hijmans, (2001). Taxonomy and new collections of wild potato species in central and southern Perú. Am. J. of Potato Res. 78(3): 197-208.
61. Sandoval, M., N. Okuhama, F. Angeles, V. Melchor, L. Candezo, J. Lao y M. Miller. (2002) Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lipidium meyenii*)

62. Serra Horacio Marcelo, Cafaro Thamara Analia, (2007). Acido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo.
63. Shaidi F. y Naczk M, (1995). Methods of análisis and quantification of phenolic compounds en food phenolics. Technomic. Publishing Co. Inc. Lancaster 281-319.
64. Shiroma-Kian Cecilia, Tay David, Manrique Ivan, Giusti M. Monica, and Rodriguez-Saona Luis E., (2008). Improving the screening process for the selection of potato breeding lines with enhanced polyphenolics content. J Agric Food Chem. 56: 9835–9842.
65. Singleton V. L. y Rossi J.A., (1965). Colorimetry of phenols with phosphomolybdic, phosphotungstic acid reagents, citado por Mathew, Sindhu and Abraham, Emilia. In vitro antioxidante activity and scavenging effects of cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. Amer J. enology vatic: 16-144.
66. Stintzing F.C., Stintzing A.S., Carle R., Frei B., Wrolstad R.E., (2002). Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-based Anthocyanin Pigments. J Agric Food Chem.50:6172-81.
67. Urquiaga I., Urzúa U., Leighton F., (1999). Antioxidantes Naturales - Impacto en la Salud. 8° Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago - Chile.
68. Vargas Franklin, Rivas Carlos, Nursamaa Abdoel, Zoltan Tamara, (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento.
69. Velázquez Paniagua Mireya, Prieto Gómez Bertha y Contreras Pérez Rocío, (2004). El envejecimiento y los radicales libres.
70. Villacrés E., Quilca N., Monteros C., Reinoso I., (2010). Caracterización física, nutricional y funcional de las papas nativas. INIA.
71. Wang S.Y., Jiao H., (2000). Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. J Agric Food Chem.48:5677-5684.
72. Wang S.Y., Lin H.S., (2000). Antioxidant Activity in Fruit and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry is Affected by Cultivar and Maturity. J Agric Food Chem.48:140-146.

73. Wrolstad R.E., (2000). Anthocyanins. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. Natural Food Colorants. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc. p. 237-252.

TESIS

74. Lavanya Reddivari, (2007). Influence of genetic variability on specialty potato functional components and their effect on prostate cancer cell lines. Tesis. Submitted to the Office of Graduate Studies of Texas A&M University.
75. Magnifique Ndambe Nzaramba, (2008). Relationships among antioxidants, phenolics, and specific gravity in potato cultivars, and evaluation of wild potato species for antioxidants, glycoalkaloids, and anti-cancer activity on human prostate and colon cancer cells in vitro. Tesis. Texas A&M University
76. Martínez Vásquez Jesica Belina, (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de heliopsis scabra. Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapam de León – Oaxaca.
77. Moenne-Loquez Calderón, Deniss Karime, (2008). Potencial antioxidante de papas y harina de papas nativas de Chiloé. Tesis. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Universidad de la Frontera.
78. Salazar González, Claudia, (2009). Evaluación de los agentes antioxidantes en extractos de flor de jamaica y aceite esencial de laurel. Tesis. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla.
79. Segura, D. Evaluación del potencial funcional de 15 genotipos de papa nativa. Lima, 2004, Tesis. Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria la Molina.
80. Ugartondo Casadevall Vanesa, (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

81. Väänänen Tiina, (2007). Glycoalkaloid content and starch structure in *solanum* species and interspecific somatic potato hybrids. Tesis. Faculty of Agriculture and Forestry. University of Helsinki.

Fuentes de Internet

1. Arrete la Calle, (2007). Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis. 17-02-2011
www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1311/d.
2. Bonierbale, M., (2002). Papas nativas. Boletín de la papa. Vol. 4 (3). 12-03-2010.
<http://redepapa.org/boletincincuentasiete.html>
3. División 2 Centro Internacional de la Papa (CIP). Base de datos del Germoplasma de papa en Latinoamérica y el Caribe, 2008. 26-05-2010
<http://sol/appdb/research/Div2GRCC/SEARCH/Search.asp>
4. Lister C. y Monro J., (2000). La nada humilde papa. Boletín de la papa. Vol. 2 (23). 19-04-2010.
<http://redepapa.org/boletinveintinueve.html>

ANEXOS

ANEXO 1

BANDAS DE ABSORCIÓN

Figura 1.1: Extracto con acetona a pH = 3.0

THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario Eli Cardenas

Fecha del informe 29/03/2010

Departamento BIOQUIMICA

Hora del informe 03:39:04p.m.

Organización Reactivos para Analisis SAC

Información Prueba de Exactitud y Precision de Longitud de Onda

gráfico de barridos

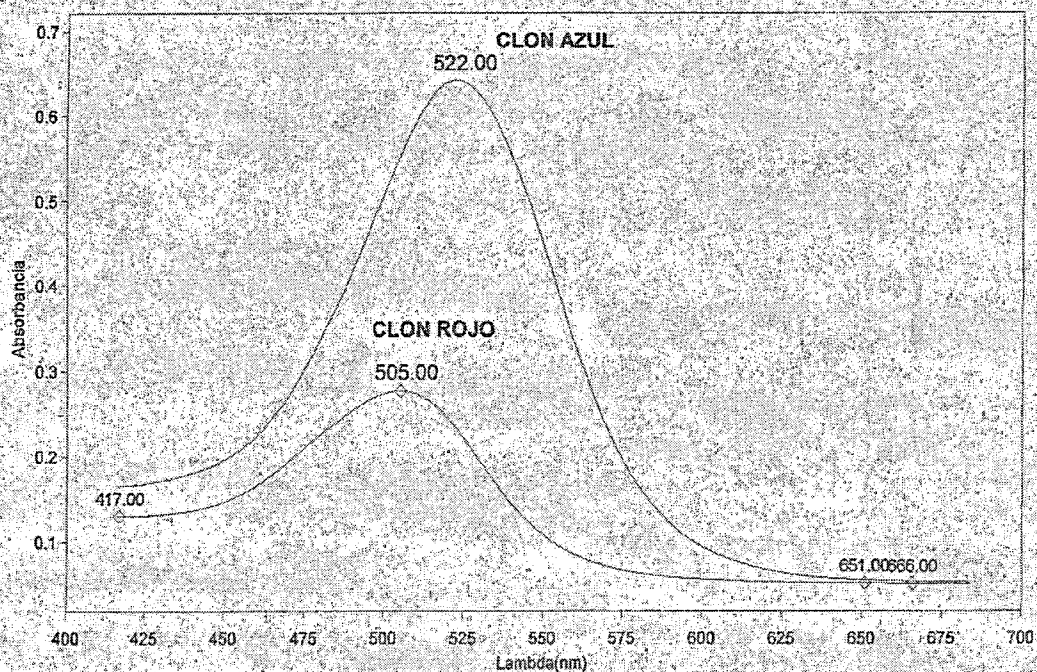


Tabla Resultados - Barridos005,CLON ROJO - A 3,Cycle01

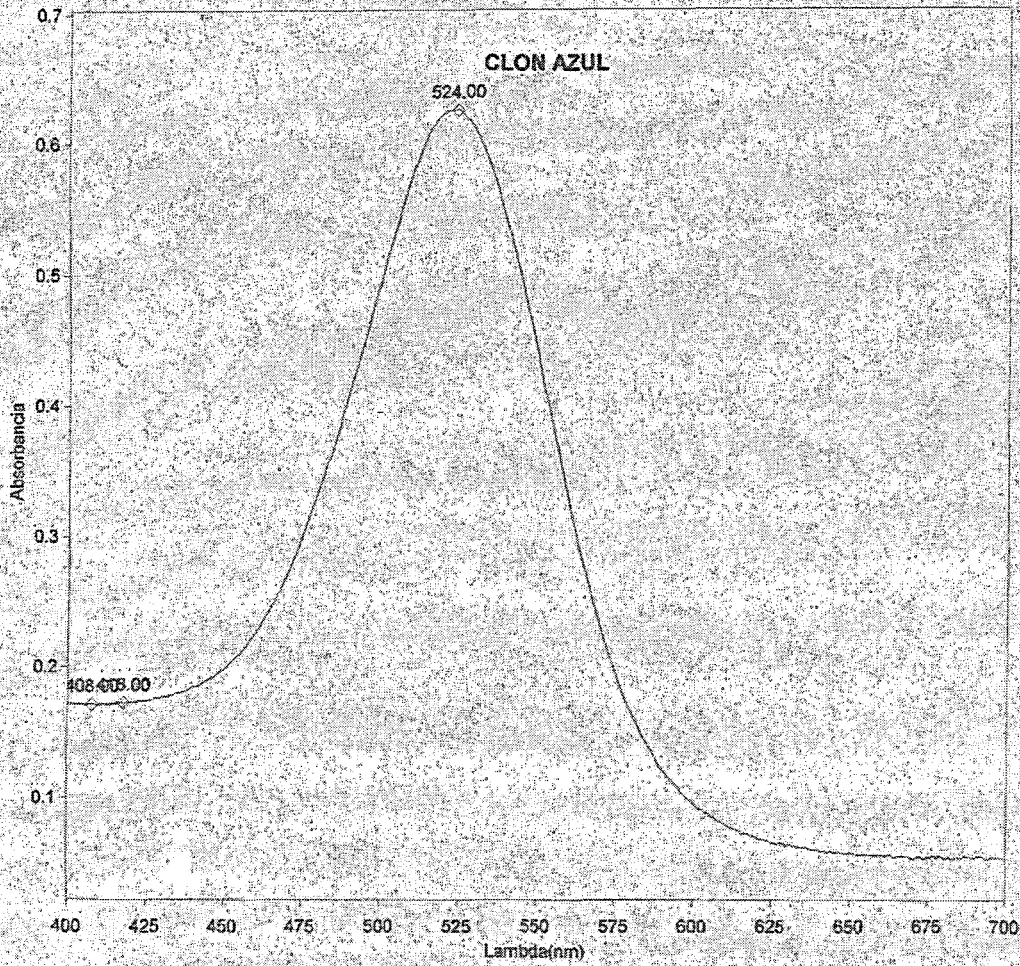
nm	A	Rastreo de Picos Método
417.00	0.1304	Encontrar 8 Picos Encima -3.0000 A
505.00	0.2765	Lambda Inicio 400.00 nm
651.00	0.0523	Lambda Parada 700.00 nm
666.00	0.0520	Ordenar por Lambda
Sensibilidad	Muy Alto	

Barridos005,CLON AZUL - A- 3,Cycle01 -

Figura 1.3: Extracto con etanol a pH = 3.0

Método Barridos - BARRIDO ROJO AZUL - A 4.sme

Descripción	(No Introducido)	Borrar Gráfico	Entre Muestras
Modo Datos	Absorbancia	Máx.Gráfico	2.000 A
Lambda Inicio	400.00 nm	Min.Gráfico	0.000 A
Lambda Parada	700.00 nm	Suavizado	Alto
Escala automática	No	Tabla de Resultados	Rastreo de Picos
Ancho de Banda	2.0 nm	Auto Guardar	Apagado
Velocidad de Barrido	Intelliscan	Nombre Archivo	Barridos015
Intervalo de Datos	Normal		
D2/Halógena	Xenón		
Ciclos	1		



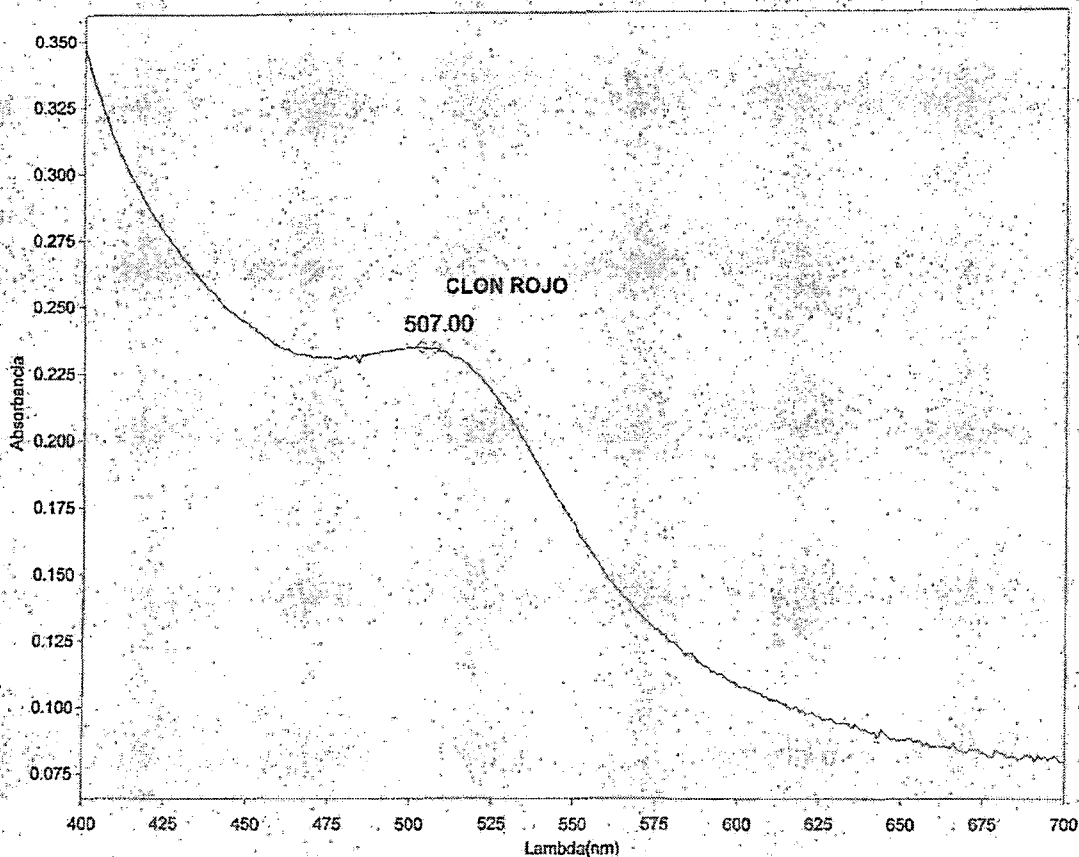
Lote : BARRIDO ROJO E3.sre

	A	B	C	D	E	F	G
1	BARRIDO ROJO E		1	2			
2	Cycle01	nm	503.00	507.00			
3	Picos	A	0.2344	0.2341			
4	BARRIDO AZUL E		1	2	3		

Figura 1.4: Extracto con etanol a pH = 3.0

Método Barridos - BARRIDO AZUL ROJO E PH 3.sre

Descripción	(No Introducido)	Borrar Gráfico	Entre Muestras
Modo Datos	Absorbancia	Máx.Gráfico	2.000 A
Lambda Inicio	400.00 nm	Min.Gráfico	0.000 A
Lambda Pañada	700.00 nm	Suavizado	Ninguno
Escala automática	No	Tabla de Resultados	Rastreo de Picos
Ancho de Banda	1.0 nm	Auto Guardar	Apagado
Velocidad de Barrido	Intelliscan	Nombre Archivo	Barridos004
Intervalo de Datos	Normal		
D2/Halógena	Xenón		
Ciclos	1		



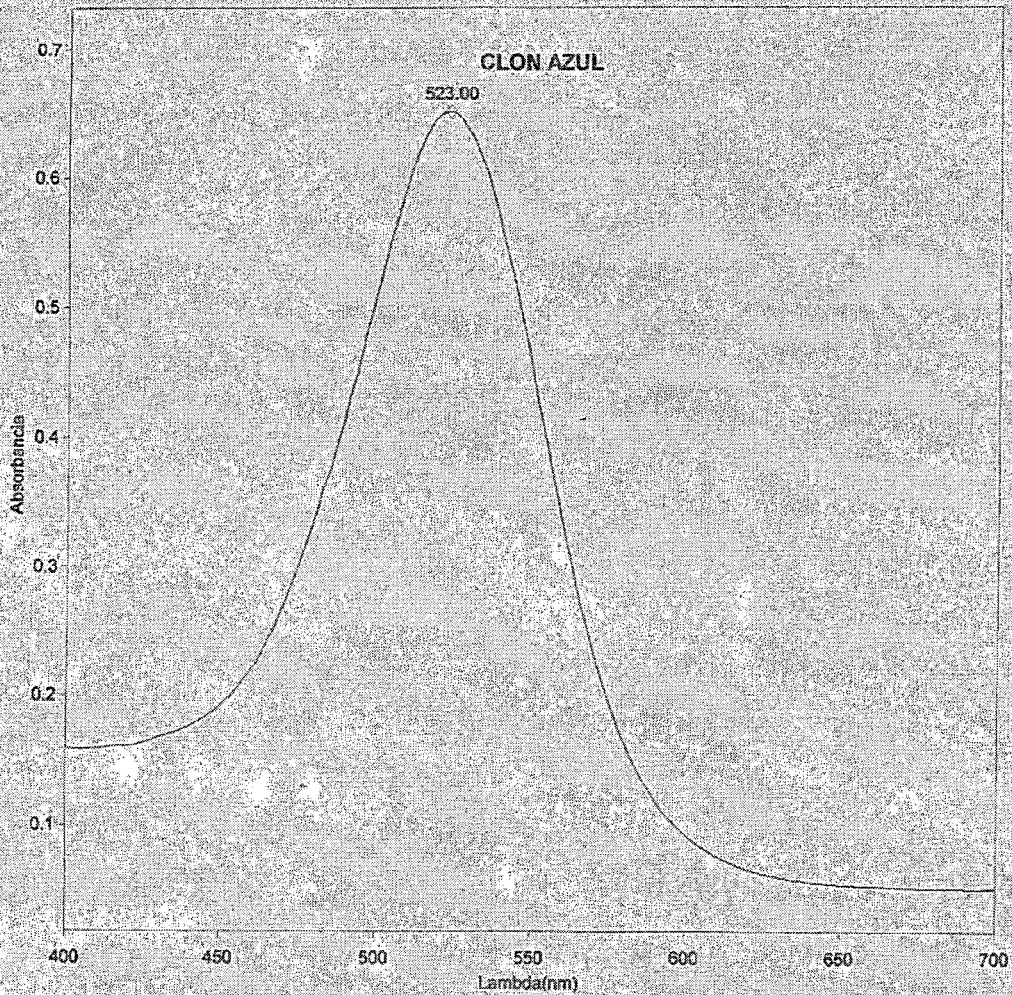
Lote: BARRIDO AZUL E3.sre

	A	B	C	D	E	F
1	BARRIDO ROJO E		1	2		
2	Cycle01	nm	503.00	507.00		
3	Picos	A	0.2344	0.2341		
4	BARRIDO AZUL E		1	2	3	4
5	Cycle01	nm	408.00	418.00	524.00	647.00
6	Picos	A	0.1716	0.1729	0.6256	0.0583
7						

Figura 1.5: Extracto con etanol a pH = 4.0

Método Barridos - (Sin título)

Descripción	(No Introducido)	Borrar Gráfico	Entre Muestras
Modo Datos	Absorbancia	Max.Gráfico	2.000 A
Lambda Inicio	400.00 nm	Min.Gráfico	0.000 A
Lambda Parada	700.00 nm	Suavizado	Ninguno
Escala automática	No	Tabla de Resultados	Rastreo de Picos
Ancho de Banda	2.0 nm	Auto Guardar	Apegado
Velocidad de Barrido	Intelliscan	Nombre Archivo	Barridos003
Intervalo de Datos	Normal	Status Seguridad	Desorientado
D2/Halógena	Xenón		
Ciclos	1		
Tiempo Ciclo	Auto		



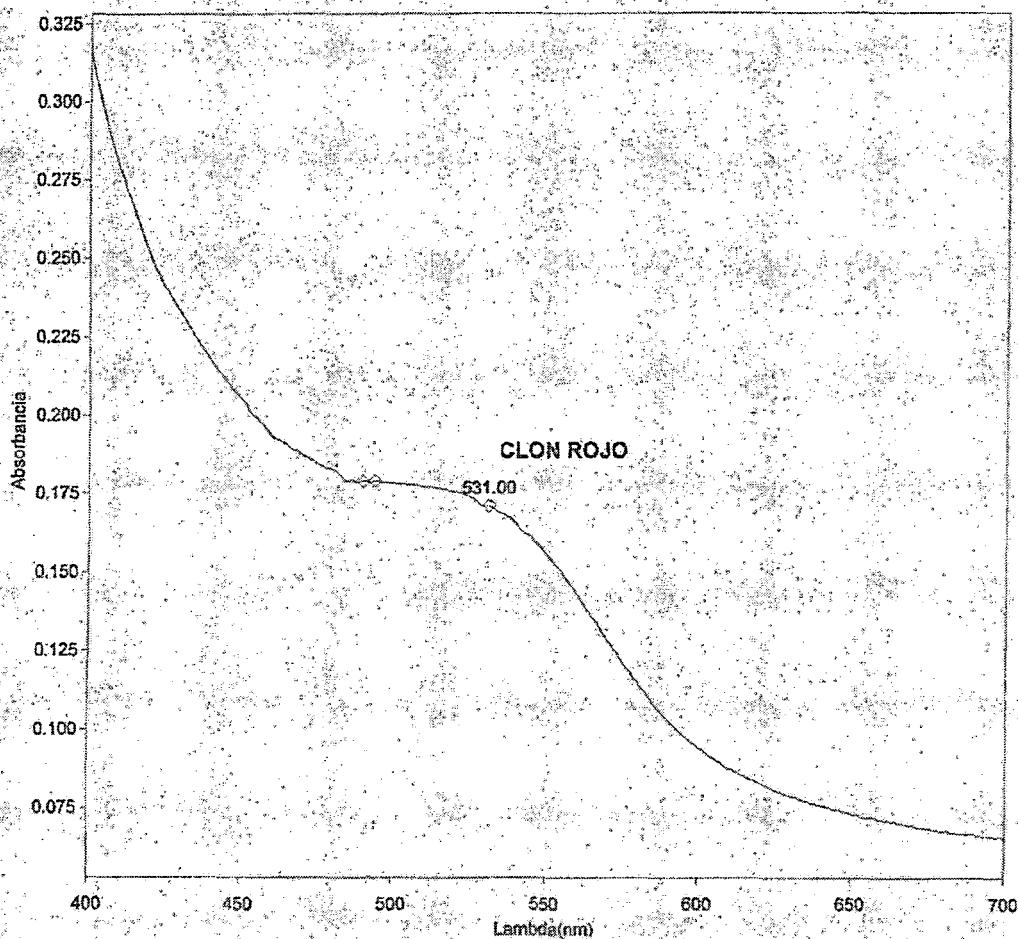
Lote : Barridos002

	A	B	C	D	E	F
1	BARRIDO AZUL E		1			
2	Cycle01	nm	523.00			
3	Picos	A	0.6515			
4						

Figura 1.6: Extracto con etanol a pH = 4.0

Método Barridos - BARRIDO AZUL E4.sme

Descripción	(No Introducido)	Borrar Gráfico	Entre Muestras
Modo Datos	Absorbancia	Máx.Gráfico	2.000 A
Lambda Inicio	400.00 nm	Min.Gráfico	0.000 A
Lambda Parada	700.00 nm	Suavizado	Ninguno
Escala automática	No	Tabla de Resultados	Rastreo de Picos
Ancho de Banda	2.0 nm	Auto Guardar	Apagado
Velocidad de Barrido	Intelligscan	Nombre Archivo	Barridos004
Intervalo de Datos	Normal	Status Seguridad	Desprotegido
D2/Halógena	Xenón		
Ciclos	1		
Tiempo Ciclo	Auto		



Lote : Barridos003

	A	B	C	D	E	F
1	BARRIDO ROJO E		1	2	3	
2	Cycle01	nm	490.00	494.00	531.00	
3	Picos	A	0.1790	0.1789	0.1709	
4						
5						

ANEXO 2

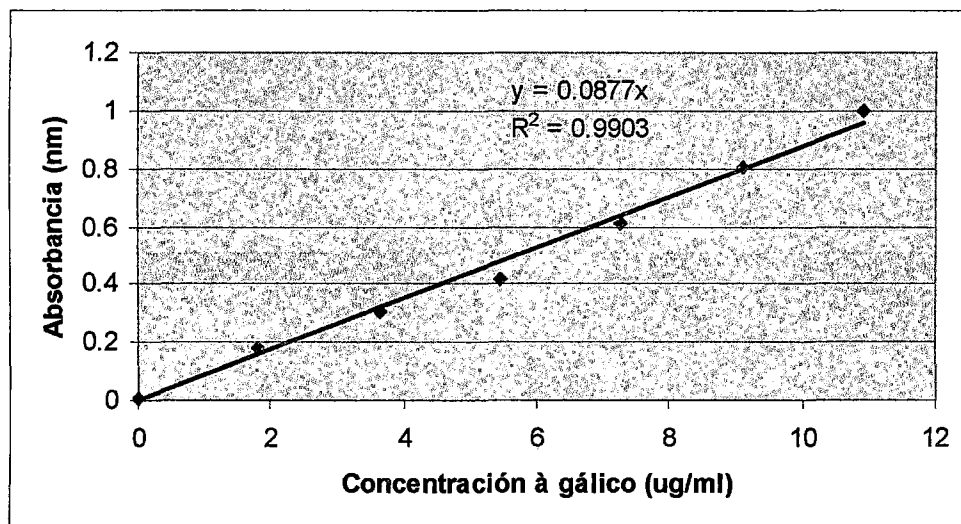
DETERMINACIÓN DE POLIFENÓLES TOTALES

Cuadro 2.1: Curva de calibración con ácido gálico para la determinación de polifenóles totales

Nº Tubos	Acido gálico (ug/ml)	Absorbancia (nm)
P1	10.9091	1.002
P2	9.0909	0.8019
P3	7.2727	0.6131
P4	5.4545	0.4153
P5	3.6363	0.3031
P6	1.8182	0.1777
Blanco	0	0.005
Muestras		
303851 - Clon Rojo	3.9031	0.3493
304239 - Clon Azul	5.3979	0.4734

La fórmula que se utilizó para determinar la concentración de polifenóles totales se determino por la curva de calibración.

Figura 2.1: Curva de calibración con ácido gálico



ANEXO 3

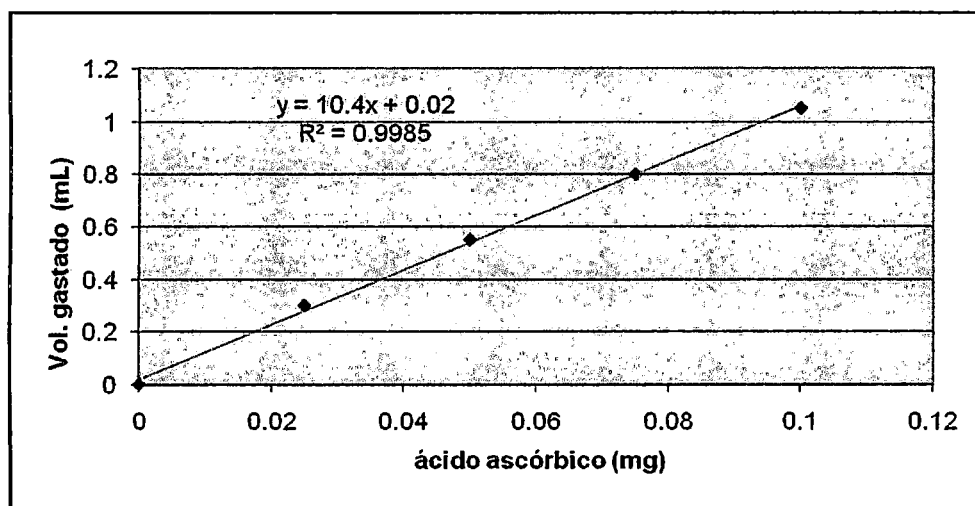
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Cuadro 3.1: Curva estándar del ácido ascórbico

Nº Tubos	Concentración á ascórbico (mg)	Volumen gastado (ml)
P1	0.025	0.3
P2	0.05	0.55
P3	0.075	0.8
P4	0.1	1.05
Muestras		
303851 - Clon Rojo	0.0197	0.225
304239 - Clon Azul	0.0149	0.175

La fórmula que se utilizó para determinar la concentración de ácido ascórbico se determinó por la curva de calibración.

Figura 3.1: Curva estándar del ácido ascórbico



ANEXO 4

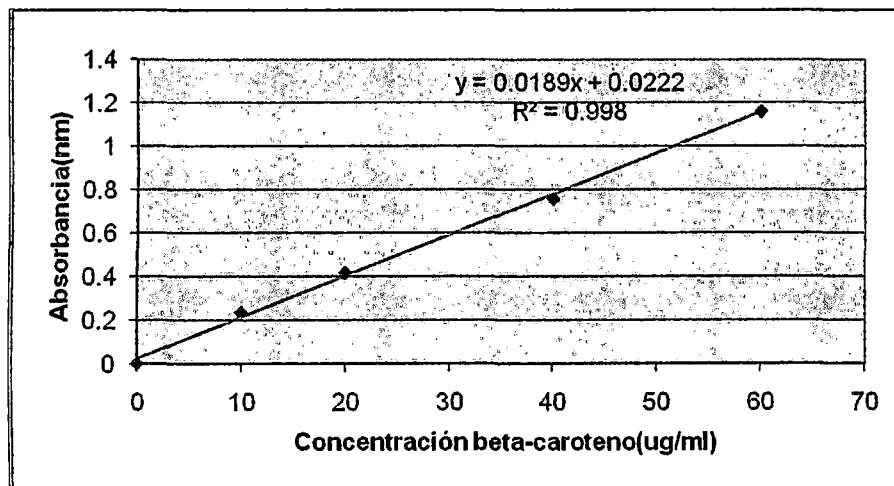
DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES

Cuadro 4.1: Curva de calibración para la determinación de β -caroteno.

Nº Prueba	β -Caroteno ug/mL	Absorbancia nm
1	10	0.2343
2	20	0.4158
3	40	0.7584
4	60	1.1629
Muestras		
303851 - Clon Rojo	7.2328	0.1589
304239 - Clon Azul	12.6190	0.2607

La fórmula que se utilizó para determinar la concentración de carotenoides totales se determinó por la curva de calibración.

Figura 4.1: Curva estándar del β -caroteno.



ANEXO 5

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

Cuadro 5.1: Resultados del porcentaje inhibición a diferentes concentraciones del extracto azul

Concentración Extracto (ug/ml)	Absorbancia Muestra (nm)	Absorbancia Blanco Muestra (nm)	Absorbancia Control DPPH (nm)	Porcentaje inhibición (%)
38.67	0.1109	0.055		62.3569024
77.33	0.1057	0.0713	0.1485	76.8350168
96.67	0.0899	0.0713		87.4747475
116.00	0.0815	0.0726		94.0067340
154.66	0.0813	0.0726		94.1414141

Peso del extracto seco:

Para 10 ml = 0.116 g

0.116 g ----- 10ml

X ----- 0.01 ml

$$X = 1.16 \times 10^{-4} \text{ g} = 116 \text{ ug}$$

∴ 116 ug ----- 3ml

X ----- 1ml

$$X = 38.67 \text{ ug/ml}$$

Cuadro 5.2: Resultados del porcentaje inhibición a diferentes concentraciones del extracto Rojo

Concentración Extracto (ug/ml)	Absorbancia Muestra (nm)	Absorbancia Blanco Muestra (nm)	Absorbancia Control DPPH (nm)	Porcentaje inhibición (%)
105	0.1429	0.0934		68.9460476
116.67	0.1317	0.0924		75.3450439
175	0.1125	0.1006	0.1594	92.5345044
204.17	0.1091	0.1048		97.3023839
233.33	0.1056	0.105		99.6235885

Peso del extracto seco:

Para 10 ml = 0.0350 g

0.035 g ----- 10ml

X ----- 0.09 ml

$$X = 3.15 \times 10^{-4} \text{ g} = 315 \text{ ug}$$

∴ 315 ug ----- 3ml

X ----- 1ml

$$X = 105.0 \text{ ug/ml}$$

Cuadro 5.3: Resultados del porcentaje inhibición a diferentes concentraciones del ácido ascórbico (vitamina C)

Concentración à ascórbico (ug/ml)	Absorbancia Muestra (nm)	Absorbancia Blanco Muestra (nm)	Absorbancia Control-DPPH (nm)	Porcentaje de Inhibición (%)
0.1667	0.1693			28.9568345
0.3333	0.1349			49.5803357
0.6667	0.1161	0.0508	0.1668	60.8513189
1	0.0739			86.1510791
1.3333	0.0567			96.4628297
1.6667	0.0571			96.2230216

ANEXO 6



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Av. de la Cultura 722
Pabellón C - Of. 106

Apartado Postal 921 - Cusco Perú
Teléfono - fax - modem: 224831

**UNIDAD DE PRESTACIONES DE SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE QUIMICA
INFORME DE ANALISIS**

Nº0698-10-LAQ



SOLICITANTE

DEYSI MARGARITA JULI MAMANI
ESDENKA ARIAS JORDAN

MUESTRA

LIOFILIZADO DE CLONES DE PAPAS NATIVAS

- 1.- 304239 (Clon Azul)
- 2.- 303851 (Clon Rojo)

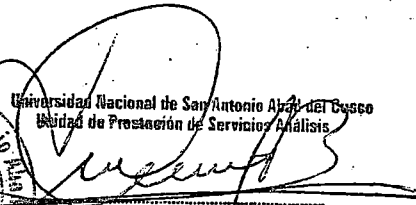
FECHA DE ENTREGA DE MUESTRA

C/28/05/2010

RESULTADO ANALISIS FISICOQUIMICO

	1	2
Humedad %	1.72	1.94
Proteína %	4.83	5.90
Grasa %	1.46	1.44
Ceniza %	3.82	3.96
Fibra %	3.64	3.35
Almidón %	80.60	83.20
Carbohidratos %	88.17	86.76
Acidez % (H ₂ SO ₄)	0.12	0.11

Cusco, 07 de Junio 2010


 Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
 Unidad de Prestación de Servicio de Análisis
Melquedes Herrera Arística
 RESPONSABLE DEL LABORATORIO
 DE ANÁLISIS QUÍMICO





UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Av. de la Cultura 722
 Pabellón C - Of. 106

Apartado Postal 921 - Cusco Perú
 Teléfono - fax - modem: 224831

UNIDAD DE PRESTACIONES DE SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE QUIMICA
INFORME DE ANALISIS

NR0878-10-LAQ

SOLICITANTE

ESDENKA ARIAS JORDAN

DEYSI MARGARITA JULI MAMANI

MUESTRA

PAPAS LIOFILIZADAS:

1.- Rojo COD 303851

2.- Azul COD 304239

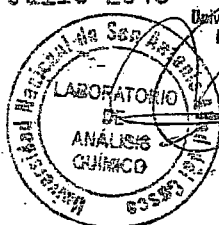
FECHA DE ENTREGA DE MUESTRA

C/15/07/2010

RESULTADO DETERMINACION AZUCAR REDUCTOR

	% Azúcar Reductor
COD 303851	0.31
COD 304239	0.52

Cusco, 16 de Julio 2010



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
 Unidad de Prestación de Servicios de Análisis

Melquedes Herrera Arce
 RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO

ANEXO 7

RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES EN LOS CLONES DE PAPA NATIVA

Cuadro 7.1: Resultados de la cuantificación de antocianinas totales del extracto acetónico.

Extractos	pH	A λ vis-max	A ₇₀₀	A	FD	mg Cy-3-glu/ L	mg Cy-3-glu/g DW	X	SD
Clon azul pH 3.0	1	0.659	0.0508	0.5713	18	171.7213115	2.575819673	2.6015	0.0363
	4.5	0.0904	0.0535						
	1	0.6691	0.0512	0.5827	18	175.1479227	2.62721884		
	4.5	0.0879	0.0527						
Clon azul pH 4.0	1	0.6461	0.0508	0.5699	17	161.7838052	2.426757078	2.4514	0.0247
	4.5	0.0777	0.0523						
	1	0.6578	0.0514	0.5815	17	165.0768253	2.476152379		
	4.5	0.0788	0.0539						
Clon rojo pH 3.0	1	0.2914	0.0555	0.1888	13	40.98574275	0.614786141	0.6677	0.0529
	4.5	0.0727	0.0256						
	1	0.3001	0.055	0.2213	13	48.04102156	0.720615323		
	4.5	0.0752	0.0514						
Clon rojo pH 4.0	1	0.2877	0.0486	0.2171	12	43.50393457	0.652559019	0.6542	0.0017
	4.5	0.0723	0.0503						
	1	0.2882	0.0494	0.2182	12	43.72435985	0.655865398		
	4.5	0.0712	0.0506						

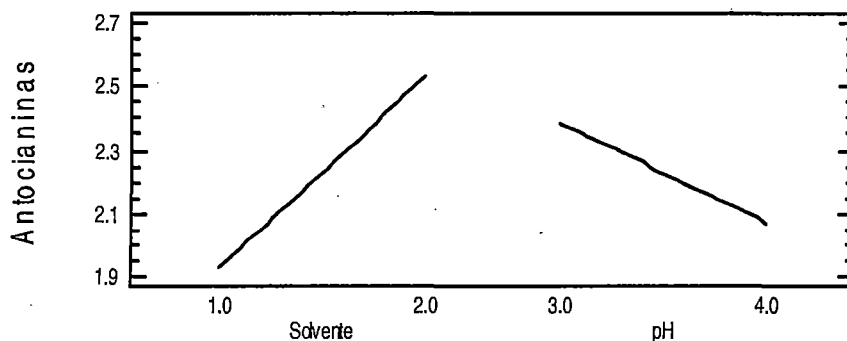
Cuadro 7.2: Resultados de la cuantificación de antocianinas totales del extracto etanólico.

Extractos	PH	A λ vis-max	A ₇₀₀	A	FD	mg Cy-3-glu/L	mg Cy-3-glu/g DW	X	SD
Clon azul pH 3.0	1	0.6326	0.0546	0.5397	14	126.1734335	1.892601502	1.8978	0.0052
	4.5	0.0964	0.0581						
	1	0.6326	0.054	0.5427	14	126.8747866	1.903121799		
	4.5	0.0931	0.0572						
Clon azul pH 4.0	1	0.647	0.0513	0.5676	12	113.7394439	1.706091658	1.6978	0.0083
	4.5	0.0821	0.054						
	1	0.6413	0.0514	0.5621	12	112.6373175	1.689559762		
	4.5	0.0808	0.053						
Clon rojo pH 3.0	1	0.2023	0.065	0.0574	2	1.91703197	0.02875548	0.0273	0.00145
	4.5	0.1494	0.0695						
	1	0.2175	0.0749	0.0515	2	1.71998513	0.025799777		
	4.5	0.1767	0.0856						
Clon rojo pH 4.0	1	0.1489	0.0548	0.0496	2	1.656529368	0.024847941	0.0236	0.0012
	4.5	0.1001	0.0556						
	1	0.1315	0.0531	0.0448	2	1.496220074	0.022443301		
	4.5	0.0881	0.0545						

ANEXO 8

GRAFICOS DE EFECTOS PRINCIPALES PARA EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS

Figura 8.1: Efectos principales para el clon 304239 (Clon Azul)



Respuesta Optimizada (Maximizar Antocianinas)

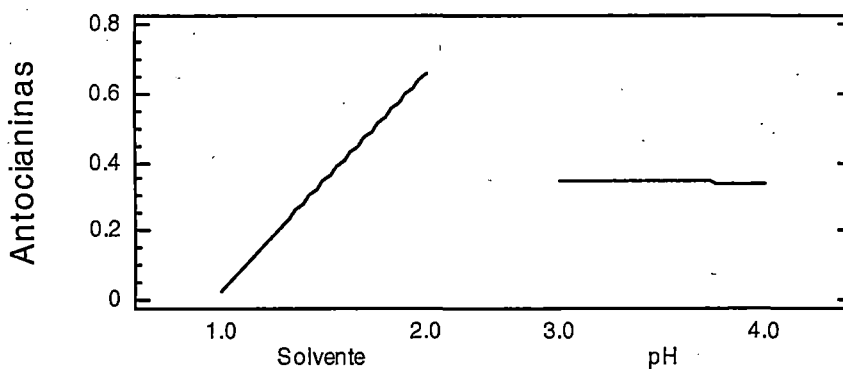
Valor Optimo = 2.6015 mg cianidina 3-glucósido/g de muestra seca

Factor Óptimo

Solvente Acetona

pH 3.0

Figura 8.2: Efectos principales para el clon 303851 (Clon Rojo)



Respuesta Optimizada (Maximizar Antocianinas)

Valor Optimo = 0.6677 mg cianidina 3-glucósido/g de muestra seca

Factor Óptimo

Solvente Acetona

pH 3.0

ANEXO 9

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Cuadro 9.1: Tiempo Vs inhibición del radical DPPH por el extracto de papa del clon azul y clon rojo

Tiempo	Clon Azul		Clon Rojo	
	Absorbancia - 25 uL	% Inhibición	Absorbancia - 100 uL	% Inhibición
0	1.3905	0.00	1.3925	0.00
2	0.9251	33.47	1.0429	25.10
4	0.8592	38.21	1.0109	27.40
6	0.8502	38.86	0.9812	29.54
8	0.8467	39.11	0.9675	30.52
10	0.8126	41.56	0.9591	31.13
12	0.7702	44.61	0.9292	33.27
14	0.7483	46.18	0.8845	36.48
16	0.7296	47.53	0.8677	37.69
18	0.7198	48.23	0.852	38.81
20	0.7069	49.16	0.842	39.53
22	0.6981	49.79	0.8352	40.02
24	0.6874	50.56	0.8243	40.80
26	0.6766	51.34	0.817	41.33
28	0.6673	52.01	0.8067	42.07
30	0.6605	52.49	0.7985	42.66

ANEXO 10
FOTOGRAFIAS
EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

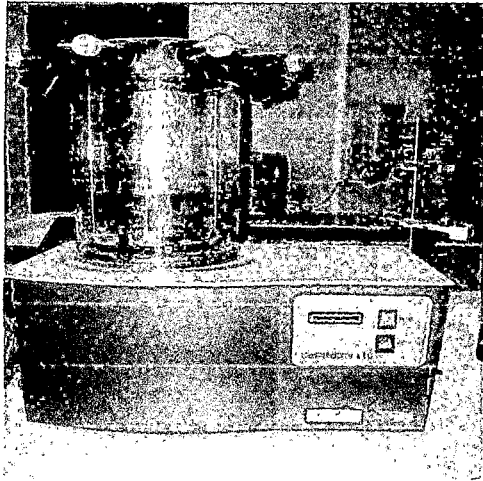


Foto 01: Liofilizador

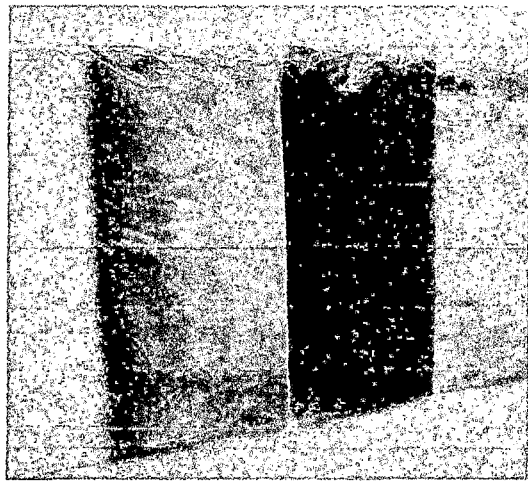


Foto 02: Muestra Liofilizada

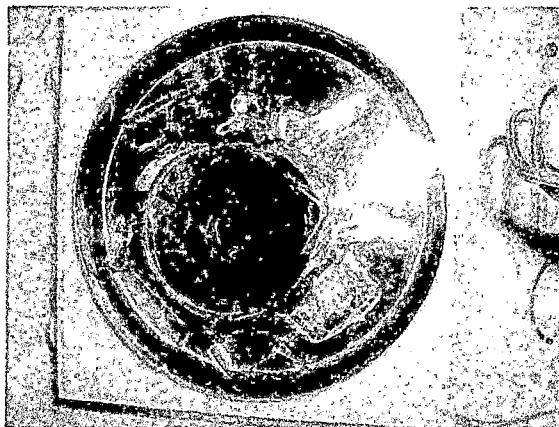


Foto 03: Extracción

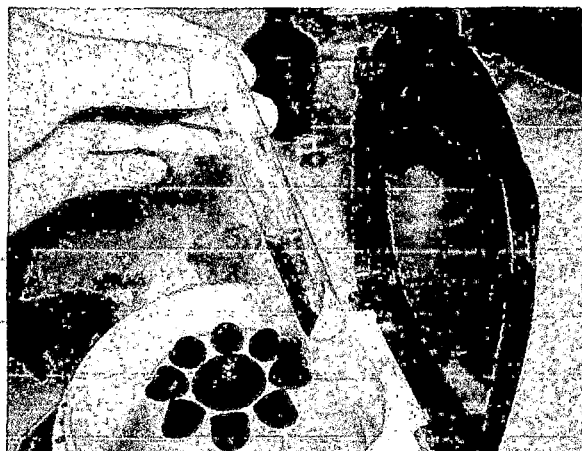
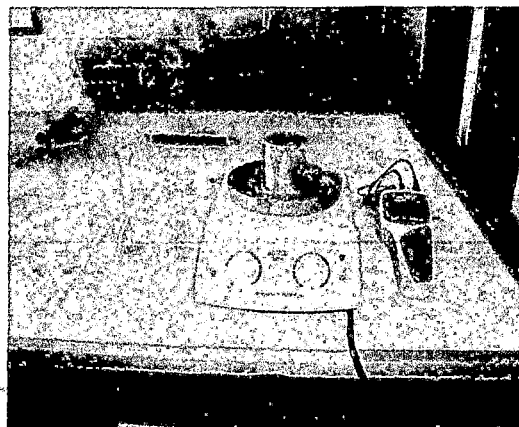


Foto 04: Centrifugación de los Extractos

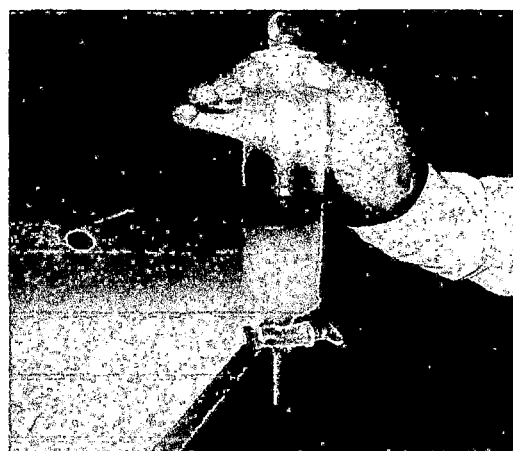


Foto 05: Mezclado con cloroformo



Foto 06: Decantado

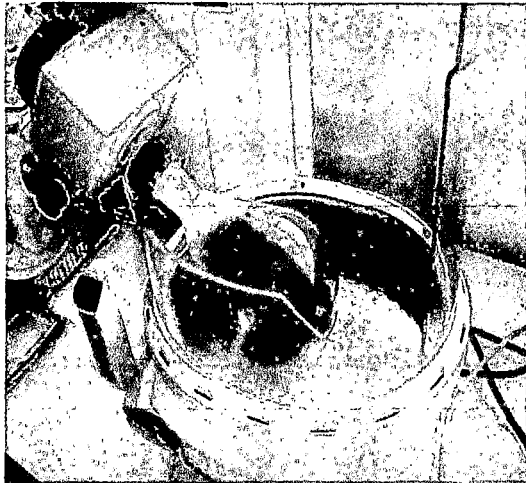


Foto 07: Concentración del extracto

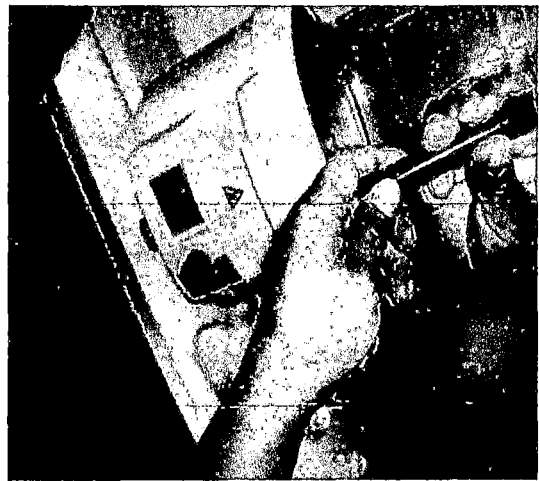


Foto 08: Extracto

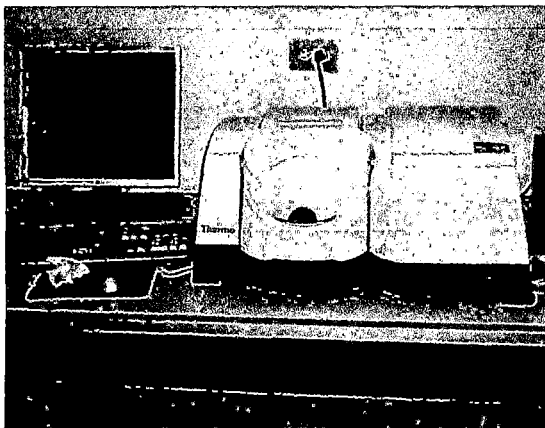


Foto 09: Espectrofotómetro