

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
UNIDAD DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE
INGENIERIA QUIMICA



INFORME FINAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
“DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
EN LA MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)”

AUTOR: CIRIA ZENaida LEÓN ROMANÍ

PERIODO DE EJECUCIÓN

01 Noviembre 2016 al 31 de Octubre 2018

(Resolución de aprobación N° 936-2016-R)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ciria Zenaida León Romani".

Callao, 2018

I INDICE

	TABLA DE CONTENIDO	
II	RESUMEN Y ABSTRACT	6
III	INTRODUCCIÓN	8
	3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	8
	3.2 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	11
IV	MARCO TEORICO	13
	4.1 GENERALIDADES	13
	4.2 CARACTERISTICAS DE LA MASHUA	14
	4.2.1 CLASIFICACIÓN CIENTIFICA	16
	4.2.2 VALOR NUTRITIVO	16
	4.2.3 ORIGEN DE LA MASHUA	17
	4.2.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA	17
	4.2.5 IMPORTANCIA Y USOS	17
	4.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS	19
	4.3.1 CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	19
	4.3.2 PRINCIPALES FITOQUIMICOS	20
	4.3.2.1 GLUCOSINOLATOS	20
	4.3.2.2 ISOTIOCIANATOS	20
	4.3.2.3 FENOLES	20
	4.3.2.4 FLAVONOIDES O BIOFLAVONOIDES	22
	4.4 METODO DE CUANTIFICACION DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS	24
	4.5 VITAMINA C O ACIDO ASCORBICO	26
	4.5.1 DISTRIBUCION DE VITAMINA C EN LOS ALIMENTOS	27
	4.5.2 IMPORTANCIA DE VITAMINA C EN LA DIETA	27
	4.5.3 METODO DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C	28
	4.6 CAROTENOIDES DEFINICIÓN	28
	4.6.1 CLASIFICACIÓN	29
	4.6.2 DISTRIBUCIÓN Y ESTADO NATURAL	30



4.6.3	DISTRIBUCIÓN DE CAROTENOIDES EN LOS ALIMENTOS	32
4.6.4	IMPORTANCIA DE CAROTENOIDES EN LA DIETA	34
4.7	EXTRACCIÓN DE LOS CAROTENOIDES	36
4.8	METODO DE CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES	38
4.8.1	EVOLUCIÓN DE LA METODOLOGIA ANALÍTICA	38
4.8.2	ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA – VISIBLE (UV- VIS)	40
4.8.2.1	EL CONCEPTO DE ABSORBANCIA	42
4.8.3	CROMATOGRAFÍA	43
4.8.3.1	ASPECTOS GENERALES	43
4.8.3.2	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	44
V	MATERIALES Y METODOS	47
5.1	MATERIALES Y REACTIVOS	47
5.2	POBLACIÓN Y MUESTRA	49
5.3	TECNICA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE MASHUA	49
5.3.1	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE MASHUA	50
5.3.2	ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA	53
5.3.2.1	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	53
5.3.2.2	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	53
5.3.2.3	DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA	53
5.3.2.4	DETERMINACIÓN DE PROTEINAS	54
5.3.2.5	DETERMINACIÓN DE GRASAS	54
5.3.2.6	DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS	54
5.3.3	ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL PRODUCTO OBTENIDO: EXTRACTO DE MASHUA	54
5.3.3.1	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	54
5.3.3.2	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	55
5.3.3.3	DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA	55
5.3.3.4	DETERMINACIÓN DE PROTEINAS	56
5.3.3.5	DETERMINACIÓN DE GRASAS	57

	5.3.3.6 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS	57
	5.3.4 DETERMINACIÓN DEL ACIDO ASCORBICO	57
	5.3.5 EXTRACCIÓN DE LOS CAROTENOIDES	58
	5.3.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS CAROTENOIDES POR EL METODO COLORIMETRICO	58
VI	RESULTADOS	60
	6.1 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA	60
	6.2 COMPOSICIÓN DE LA MASHUA	60
	6.3 CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C EN LA MASHUA	60
	6.4 CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LA MASHUA	61
	6.5 CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MASHUA	61
VII	DISCUSIÓN	62
VIII	REFERENCIALES	63
IX	APENDICE	67
	9.1 CARACTERISTICAS FISICAS DE LA MASHUA	67
	9.2 MEDICIÓN DE GRADOS BRUX Y pH DE LA MASHUA	67
	9.3 CONTENIDOS DE MINERALES EN LA MASHUA	67
X	ANEXO N° 01: LA MATRIZ DE CONSISTENCIA	68
	ANEXO N° 02: CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS	69

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS

CUADRO 4.1	VARIEDAD DE LA MASHUA NATIVA	15
CUADRO 4.2	VALOR NUTRITIVO	16
CUADRO 4.3	DISTRIBUCIÓN DE CAROTENOÍDES EN DIVERSOS ALIMENTOS.	33
CUADRO 5.1	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES TROLOX	53
CUADRO 6.1	ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA	60
CUADRO 6.1	ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C EN LA MASHUA	60
CUADRO 6.3	CAROTENOÍDES TOTALES EN LA MASHUA	61
CUADRO 6.4	COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MASHUA	61
CUADRO 9.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MASHUA	67
CUADRO 9.2	MEDICIÓN DE GRADOS BRUX y pH DE LA MASHUA	67
CUADRO 9.3	CONTENIDO DE MINERALES EN LA MASHUA	67



TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 4.1 MASHUA NATIVA DE COLOR AMARILLO	15
FIGURA 4.2 ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE α , β y γ CAROTENO, β - CRIPTOXANTINA, LICOPENO, LUTEINA Y ZEAXANTINA	31
FIGURA 4.3 ESTRUCTURA DEL RETINOL	35
FIGURA 4.4 COMPONENTES BASICOS DE UN ESPECTROFOTOMETRO	41
FIGURA 4.5 ILUSTRACIÓN DE LAS DEFINICIONES DE I_e e I_0	42
FIGURA 4.6 SISTEMA BASICO DE HPLC	46



II RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar los compuestos bioactivos en la mashua (*Tropaeolum tuberosum*), proveniente de las alturas andinas de Perú. La cuantificación de estos compuestos se desarrolló mediante el método DPPH, (reactivo: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), propuesto por Blois (1958); y también por otro método denominado ABTS (reactivo: ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotrazolin-6-sulfónico); ambos se basan en métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras o mezclas acuosas. Se obtuvo 77,5 mg/100 g de ácido ascórbico; 2,36 mg/100 g de carotenoides; 82,60 mg de ácido clorogénico/100g y capacidad antioxidante, según el método DPPH 241,95 mg eq trolox/g, y ABTS (lipofílica) 262,31 mg eq trolox/g y ABTS (hidrofílica) 279,25 mg eq trolox/g.

Del análisis de la mashua en cuanto se refiere a sus características físicas se obtuvo pH igual a 6,2 y grados Brix igual a 8,5.

La composición proximal de la mashua es : humedad 84,43%, cenizas 0,56%, fibra bruta 0,58%, proteínas 1,52%, lípidos 0,28% y carbohidratos 12,93%.

El contenido de minerales expresado en mg/100g es de 12,00 de calcio, 190,00 de potasio y 29,00 de fósforo.

De los resultados obtenidos se concluye que la mashua posee gran cantidad de compuestos bioactivos.

Palabras clave: mashua (*Tropaeolum tuberosum*), ácido ascórbico, carotenoides, ácido clorogénico, capacidad antioxidante.



ABSTRACT

The objective of the study was to determine the bioactive compounds in the mashua (*Tropaeolum tuberosum*), from the Andean highlands of Peru. The quantification of these compounds was developed by means of the DPPH method (reactive: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), proposed by Blois (1958); and also by another method called ABTS (reactive: 2,2'-azino-bis-3-stibenzotrazolin-6-sulfonic acid); both are based on spectrometric methods that have been applied to measure the total antioxidant activity of solutions or pure substances or aqueous mixtures. 77.5 mg / 100 g of ascorbic acid was obtained; 2.36 mg / 100 g of carotenoids; 82.60 mg of chlorogenic acid / 100 g and antioxidant capacity, according to the method DPPH 241.95 mg eq trolox / g, and ABTS (lipophilic) 262.31 mg eq trolox / g and ABTS (hydrophilic) 279.25 mg eq trolox / g.

From the analysis of the Mashua as regards its fixed characteristics, pH was obtained equal to 6.2 and Brix degrees equal to 8.5.

The proximal composition of the mashua is: moisture 84.43%, ash 0.56%, crude fiber 0.58%, protein 1.52%, lipids 0.28% and carbohydrates 12.93%.

The mineral content expressed in mg / 100g is 12.00 of calcium, 190.00 of potassium and 29.00 of phosphorus.

From the results obtained, it is concluded that Mashua has a large number of bioactive compounds.

Key words: mashua (*Tropaeolum tuberosum*), ascorbic acid, carotenoid, chlorogenic acid, antioxidant capacity.



III. INTRODUCCIÓN

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

a) DESCRIPCIÓN Y ANALISIS DEL TEMA

La mashua es un tubérculo oriundo del Perú prehispánico, que ha sido cultivada desde tiempos remotos. Es una planta herbácea perenne, semirrastrera o trepadora que alcanza hasta un metro de altura. Produce tubérculos comestibles perfumados y de sabor algo fuerte que mide entre cinco y quince centímetros de largo. Se han reconocido más de cien variedades de mashua que varían entre los colores blanco, amarillo, anaranjado, violeta y rojizo, muchas veces punteados con rojo brillante y con líneas moradas (Encarta, Biblioteca de Consulta 2012)

Los tubérculos tienen forma elipsoidal y a menudo están ramificados; sus tallos aéreos tienen forma cilíndrica, muchas ramificaciones y son de color púrpura claro; sus hojas son alternas de color verde con puntos rojos (Encarta, Biblioteca de Consulta 2012)

Las flores son bisexuales y tienen matices que van del naranja al escarlata y es polinizada por insectos y pájaros. Los tubérculos de mashua tienen entre catorce y dieciséis por ciento de proteínas, se consumen hervidas o asadas después de haberlos soleado con la finalidad de azucararlos; los tubérculos tiernos no necesitan ser pelados y sus hojas y flores se consumen cocidas. (Encarta, Biblioteca de Consulta 2012)



En la medicina pre hispánica se utilizó el cocimiento de mashua, perejil y zumo de lima, como bebida que ayudaba a eliminar cálculos renales; en la medicina folclórica actual se usa para eliminar cálculos renales, dolencias prostáticas y contra la anemia. (Encarta, Biblioteca de Consulta 2012)

La mashua es un efectivo antibiótico y actúa sobre bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococo*, y hongos como la *Candida albicans*. (Butera et al; 2002)

El efecto de la mashua sobre la próstata se debe a la sustancia conocida como isotiocianato que contiene este alimento. Según la doctora Elena Villacrés, Directora del Departamento de Nutrición del Instituto de Investigación Agropecuarios (INIAP), este compuesto inhibe el crecimiento de células inflamatorias. Además atrapa a los radicales libres, sustancias que se acumulan por el estrés, las grasas saturadas, la contaminación, etc. Los radicales libres son los causantes del envejecimiento celular y la formación de células cancerígenas. (Butera et al; 2002)

El isotiocianato también es un precursor de aceites esenciales que interrumpen el crecimiento de tumores en el organismo, explicó Villacrés; la doctora Gabriela Loza, nutricionista del Centro Nutri Stetic, agregó que la mashua tiene propiedades antioxidantes que previenen el envejecimiento celular porque sus componentes son flavonoides, polifenoles, carotenos y ácido ascórbico. (Butera et al; 2002)

La mashua se conoce también con los nombres de isaño, año, cubio o papa amarga; se utiliza para elaborar antibióticos, ayuda a reducir los niveles de testosterona, por lo que suele ser recomendada para prevenir y curar



afecciones a la próstata; tiene propiedades curativas para el hígado y los riñones. (Butera et al; 2002)

El valor nutritivo de la mashua supera con creces al de los cereales como el arroz y la papa, comer grandes cantidades de mashua produce en los caballeros, lo que hoy se llamaría disfunción eréctil. (Butera et al; 2002)

La investigación sobre los nutrientes de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*) permitirá promover la preservación de las especies más relevantes, por sus propiedades curativas, y generar fuentes de ingresos para los productores locales.

B) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Problema General:

¿El contenido de compuestos bioactivos serán características determinantes de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)?

Problemas Específicos:

1. ¿Cuál será la composición química de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)?
2. ¿Qué contenido de hierro, magnesio y fósforo tendrá la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)?
3. ¿Cuáles serán las propiedades físicas de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)?

OBJETIVOS Y ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN

- **Objetivo General:** Determinar los compuestos bioactivos en la mashua (*Tropaeolum tuberosum*).



- **Objetivos Específicos:**

- Analizar la composición química de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*).
- Evaluar el contenido de hierro, magnesio y fósforo en la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)
- Analizar las propiedades físicas de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)

ALCANCES DE LA INVESTIGACION

El tema de investigación es aplicada. Los resultados del tema de investigación a nivel de laboratorio serán en beneficio de los siguientes sectores:

- ✓ **Salud** : En beneficio de la población en general para prevenir y combatir enfermedades infecciosas, enfermedades del tracto digestivo como el cáncer de colon, reforzar las defensas del organismo, prevenir los malestares cardiovasculares etc.
- ✓ **La industria farmacéutica y alimentaria:** Se verá favorecida encontrando en los tubérculos nativos una fuente de industrialización de suplementos medicinales.

El código del proyecto de investigación según la UNESCO es 2306.90.

3.2 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

- a) La ejecución del tema de investigación permitirá desarrollar nuevos estudios orientados a comprobar la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos como son los flavonoides, ácido ascórbico, polifenoles y carotenos. Las propiedades antioxidantes de estos compuestos ayudan a neutralizar los radicales libres y a eliminar determinadas sustancias tóxicas,



reduciendo la probabilidad de desarrollar cáncer, inhiben el crecimiento de bacterias dañinas para el organismo, favorece el sistema inmunitario, previene enfermedades cardiovasculares al reducir la presión arterial.

- b) La presente investigación sobre la determinación de compuestos bioactivos en la mashua (*Tropaeolum tuberosum*), es importante debido a que posee alto contenido de compuestos antioxidantes fenólicos como lo destaca en el año 2007 el artículo denominado Great Mashua, publicado en la revista Agricultural Research por investigadores del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de N.A., además el contenido de vitamina C o ácido ascórbico en la mashua es 2 a 3 veces más que en la naranja y por lo tanto tiene un papel destacado en el mantenimiento de cartílagos, huesos y dientes; ayuda a la absorción del hierro y es imprescindible en la formación de colágeno, por lo que previene contra afecciones de la piel y contribuye a la cicatrización de heridas y quemaduras, también es sabido que mejora la visión y reduce la posibilidad de aparición del glaucoma y cataratas, además de combatir el estreñimiento por sus propiedades laxantes. Debido a la alta concentración de carotenos, la mashua actúa como antioxidante previniendo el envejecimiento celular y protegiendo el organismo frente a radicales libres, a la vez que aumenta la eficiencia del sistema inmunitario y se reducen las probabilidades de ataques cardíacos, los carotenos son también requeridos por nuestro organismo para la formación de vitamina A.



IV. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), conocida también como “añu”, “isaño” o “cubio”, es una planta herbácea perenne originaria de la región andina, donde también fue domesticada. Las evidencias arqueológicas sugieren que sus tubérculos ya eran consumidos desde hace más de 7500 años. (CIP 2013).

Es una planta herbácea, semirrecta de 20 a 80 cm de alto. Sus tallos aéreos son cilíndricos, delgados, ramificados, de color púrpura o violado purpura oscuro. Los tubérculos de la mashua, son menos variables en su forma y color. Su color es bastante variado, y la mayoría tienen color amarillo (Tapia, 1990).

La mashua comparado con la papa, el olluco y la oca presenta una mayor capacidad antioxidante, con alto contenido de antocianinas y carotenoides, atributos que hacen de la mashua un cultivo con un gran potencial, y que podría ser utilizado en la mejora para la resistencia a plagas, la industria farmacéutica y en la nutrición (Arias, M.M. 2011). En el pasado la mashua fue base de la alimentación de las poblaciones andinas debido a su alto valor nutricional reflejado en el contenido de proteínas, carbohidratos, y vitamina C (ácido ascórbico); por el alto contenido de glucosinolatos es empleado como medicina en algunos pueblos andinos. Los glucosinolatos aromáticos que al ser hidrolizados se transforman en isotiocianatos que poseen propiedades antibióticas, insecticidas, nematocidas, anticancerígenos y diuréticas, lo que contribuye a sustentar el uso tradicional de la mashua en la medicina floclórica de los Andes. (Manrique, I. Arbizu, C., Vivanco, F., Gonzales, R., Ramirez, C., Chavez, O., Tay, D., Ellis, 2014).



4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MASHUA

La planta de la mashua es inicialmente erecta, aunque a la madurez es semi postrada, tiene hojas ovaladas, la cara superior es de color verde mate y la cara inferior de un verde claro. Los tubérculos tiene yemas alargadas y profundas, son de forma cónica o elipsoidal según su coloración se pueden clasificar en:

- Tubérculos de color uniforme, generalmente blanco, amarillo o anaranjado.
- Tubérculos con pigmentos de antocianina ubicados solo en las yemas.
- Tubérculos muy coloreados en las yemas con antocianinas.
- Tubérculos con yemas pigmentadas y con franjas longitudinales rojas o moradas (Tapia, 1990). En su cultivo no es necesario el uso de fertilizantes ni pesticidas lo que se explica por los principios de control nematocida e insecticida que posee la planta de mashua, debido a la presencia de fitoquímicos (Grau, et al 2003).

La mashua cruda tiene un sabor amargo, algo picante, parecido al sabor del rábano o la mostaza, esta característica ha hecho que se la consuma únicamente sancochada.

Los tubérculos son cónicos, alargados y de yemas profundas, miden entre 5 y 15 cm de largo y poseen una textura arenosa debido a su contenido de carbohidratos y agua. Sus colores son variados, que van desde el amarillo, anaranjado, blanco, rojo morado, gris negro; su sabor es picante.



FIGURA 4.1

MASHUA NATIVA DE COLOR AMARILLO



Fuente: Almeida, Carolina "Recuperación de alimentos ancestrales en la comida moderna", 2010.

CUADRO 4.1

VARIEDAD DE LA MASHUA NATIVA

Variedad de mashua nativa	Color
Occe izaño	Plomo
Chiara izaño	Negro
Chupica izaño	Rojo
Checche izaño	Amarillo con ojos azules
Izaño	Amarillo
Wilajachasquiri	Amarillo con rayas rojas

Fuente: Almeida, Carolina "Recuperación de alimentos ancestrales en la comida moderna", 2010.



4.2.1 CLASIFICACION CIENTIFICA

División : Espermatofita

Subdivisión : Angiospermas

Clase : Dicotiledoneas

Superorden: Dicotilidas

Orden : Geraniales

Suborden : Geraminea

Familia : Tropaeolum

Género : Tuberosum

Especie : Tropaeolum tuberosum

Fuente: Ruiz y Pavón, 1998.

4.2.2 VALOR NUTRITIVO

La mashua tiene un alto contenido de proteínas, carbohidratos, fibras y calorías, es rica en vitaminas B y C, su valor nutritivo supera al de algunos cereales y de la papa, por lo que forma parte de la dieta diaria de los habitantes de las zonas rurales de nuestro Perú. La presencia de glucosinolatos en este tubérculo tiene efectos beneficiosos para el sistema inmunológico.

Se presenta el valor nutritivo en g/100g de mashua.

CUADRO 4.2
VALOR NUTRITIVO

Concepto	Contenido
Humedad	86,00
Proteína	1,60
Grasas	0,60
Fibra	0,80
Carbohidratos	11,00

Fuente: CIP, 2009

4.2.3 ORIGEN DE LA MASHUA

La mashua es una planta originaria de los andes centrales, desde Ecuador hasta Bolivia, cerca de los 3,000 m.s.n.m. se encuentran especies silvestres que podrían ser sus ancestros (Grau et al., 2003). Sin embargo, existe una mayor concentración de diversidad en su centro de origen, la cual se encuentra entre Perú y Bolivia a una altitud entre 3500 a 3800 m.s.n.m. (Grau et al., 2003).

4.2.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA

Las zonas de producción de mashua se ubican desde 3000 a 3800 m.s.n.m., de preferencia en la sierra de las regiones de Ancash, Junín, Cuzco, Ayacucho. Los tubérculos comestibles de mashua se cultivan en áreas pequeñas en sistemas agrícolas tradicionales y en condiciones marginales (Ortega et al, 2006).

El rango latitudinal del cultivo de mashua en los andes es de 8°N y 24°S y la altitud varía desde 2400 hasta 4,300 m.s.n.m., con la más frecuente ocurrencia entre 3000 y 3700 m.s.n.m. donde las temperaturas medias anuales están en el rango de 8-11 °C (Grau et al., 2003).

4.2.5 IMPORTANCIA Y USOS

Los tubérculos de la mashua tienen "fama" de tener efectos beneficiosos sobre el hígado, los riñones y alivian trastornos de próstata y urinarios (Grau et al., 2003), es usado como depurativo, para curar enfermedades venéreas, también detiene hemorragias y cicatriza heridas internas y externas (Cadima, 2006).

El contenido de agua en los tubérculos de mashua va desde 79 a 94%; los tubérculos secos pueden contener de 14 a 16% de proteína, casi el 80% de carbohidratos, 9 ug/100g de

β -caroteno y alrededor de 480mg de vitamina C/100g (Travis, 1999). También contienen todos los aminoácidos esenciales e isotiocianatos, los cuales son usados en etnomedicina, compuestos fenólicos, antioxidantes como la vitamina C, β -caroteno, flavonoides y antocianinas (Travis, 1999).

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios, responsables del sabor picante y aroma sulfuroso de algunas plantas, que produce, como resultados, el rompimiento en isotiocianatos. Estos han captado atención debido a sus propiedades como acción antitumoral, biopesticidas, antiafrodisiacos (Ortega et al., 2006).

Los tubérculos recién extraídos del suelo son amargos. Tradicionalmente se consume en forma de "tayacha", que es la mashua cocida, congelada y sopada en miel de caña, ocasionalmente se utiliza para espesar sopas o también en "wathia", similar a la oca, luego de asolear por varios días. (Arbizu y Tapia, 1992).

Se atribuye a la mashua propiedades antiafrodisiacas a través de disminuir la cantidad de testosterona y dehidrotestosterona en la sangre. Se dice que reduce el instinto sexual y se cuenta que las tropas de los incas llevaban como fiambre para olvidarse de sus mujeres; hoy se sabe que los niveles de testosterona se reducen significativamente en ratas machos alimentados con este tubérculo (Arbizu y Tapia, 1992).

Los glucosinolatos pueden conferir resistencia a insectos, herbívoros, hongos, moluscos, bacterias y microorganismos; las propiedades defensivas de estos aumentan cuando los tejidos son fragmentados, por daño mecánico, infección o ataque de plagas, puesto que el rompimiento celular expone los glicosinalatos y los pone en contacto con la enzima mirosinasa (una β - tioglucosidasa) (Arias, 2011).



4.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Las sustancias bioactivos o fitoquímicos se encuentran abundantemente en frutas y verduras, y en las bacterias "ácido lácticos" presentes en productos lácteos obtenidos por fermentación ácido láctica como yogurt, leche cortada y verduras fermentadas (Meléndez Martínez, A. 2002)

4.3.1. CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Según Dittrich, H.Y. Leitzmann se clasifican en:

Compuestos fenólicos y se encuentran en una amplia variedad de alimentos de origen vegetal y sus derivados como cebolla, manzana, bayas, vino.

Fitoesteroles, presentes en diversos aceites vegetales, como el de oliva, maíz, girasol soja.

Fitoestrógenos, los más estudiados son las isoflavonas y lignanos por sus potenciales efectos benéficos para el organismo. Dentro de cada fase de compuestos bioactivos existen diversas subclases, por ejemplo los ácidos fenólicos, flavonoles, flavones, flavononas y lignanos son subclases de los compuestos fenólicos. Estas subclases tienen en la mayoría de casos, la misma estructura química genérica.

Carotenoides o tetraterpenoides son una clases de pigmentos con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranylgeranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).



4.3.2. PRINCIPALES FITOQUIMICOS

4.3.2.1 GLUCOSINOLATOS

Según Arias, M.M.,2011 son sustancias aromáticas picantes que conceden un sabor especial a la mostaza, rábano, coles y otras verduras, liberan los compuestos aromáticos y bioactivos sólo cuando son cortados. Se les atribuye efectos anticancerígenos y son efectivos en infecciones urinarias.

Los glucosinolatos son sustancias liposolubles, se absorben en el intestino delgado y se eliminan casi sin alteraciones por las vías urinarias, es por este motivo por lo que los aceites aromáticos de las raíces y hojas picantes de las plantas citadas son efectivos en las inflamaciones de las vías urinarias.

4.3.2.2 ISOTIOCIANTOS

Según Arias, M.M.,2011 existen como sus glucosinolatos conjugados en una amplia variedad de vegetales crucíferos, los isotiocianatos son responsables, en parte del sabor especial de ciertos vegetales como el berro y los repollos.

Los isotiociantos son agentes quimiopreventivos más efectivos conocidos. Una amplia variedad de isotiocianatos previenen el cáncer de diferentes tejidos incluyendo el de pulmón, mamas, esófago, hígado, intestinos, vesícula biliar evidenciada en experimentos con ratas.

4.3.2.3 FENOLES

Según Luximon Ranma, A. Bahorum T. y Crozier 2003 en este grupo se incluyen los monofenoles, polifenoles, flavonoides y taninos; las frutas y vegetales frescos, así como los cereales contienen cantidades apreciables de fenoles naturales. Los tres grupos más importantes de fenoles dietéticos son los flavonoides, ácidos fenólicos y los polifenoles; los flavonoides son el grupo más numerosos de fenoles



vegetales y los más estudiados. Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico.

Los polifenoles o polímeros fenólicos, concocidos como taninos, son compuestos de alto peso molecular que se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados.

Los monofenoles presentan un solo grupo $-OH$ en el anillo aromático del benceno. Entre los polifenoles existen, los difenoles, con dos grupos $-OH$ en el anillo aromático, como la hidroquinona; los trifenoles, con tres grupos $-OH$ en el anillo aromático, siendo el ácido gálico un ejemplo de estos, está presente en forma esterificada en las catequinas de té, o condensado en taninos hidrolizables (ácidos tánicos)

La vainillina cuyo nombre químico es 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es otro componente del grupo de los fenoles simples, y es un saborizante popular.

Ejemplos de los derivados del ácido hidrocínámico son los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico, generalmente están presentes en diversas formas conjugadas, siendo más frecuentes como ésteres que como glucósidos, el miembro más importante de este grupo, en los alimentos, es el ácido clorogénico.

Los flavonoides son el grupo simple de fenoles más grande en alimentos vegetales; son compuestos de bajo peso molecular que generalmente existen enlazados a moléculas de azúcares. Los flavonoides están agrupados en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son moléculas de pigmentos rojos, azules y púrpuras. Las antoxantinas, que incluyen flavonoles, flavonas e isoflavonas son moléculas incoloras o de colores que oscilan desde el blanco hasta el amarillo.



Los polifenoles tienen acción antioxidante, pueden reducir la peroxidación de los lípidos, el consumo frecuente de frutas y vegetales frescos se asocia con una menor incidencia de cáncer en humanos y en carcinogénesis experimental. Los polifenoles se hallan en las capas superficiales de verduras, frutas, cereales y otras semillas, para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores; son también anticoagulantes, antimicrobianos, inmunoestimulantes y reguladores de la presión arterial y de la glucemia.

Las principales fuentes de fenoles y polifenoles son frambuesas, zarzamoras, el té, manzanas, peras, guayabas, frambuesas, nueces.

4.3.2.4 FLAVONOIDES O BIOFLAVONOIDES

Los flavonoides (del latín flavus, amarillo) y las antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, metanol y etanol, con características de glucósido; contienen como aglucon un núcleo flavilo al cual se une a una fracción de azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. En realidad, algunos flavonoides son precursores en la biosíntesis de antocianinas. Son pigmentos no nitrogenados, con un esqueleto de difenilpropano derivado del ácido shiquímico. Los flavonoides pueden tener estructuras simples o muy complejas, debidos a la polimerización, como es el caso de los taninos condensados, que alcanzan pesos superiores a 30,000 Da. Hay 13 subclases de flavonoides, lo que da un total de más de 5000 compuestos, que proporcionan colores amarillo y naranja a frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas, duraznos, naranjas y limones; así como a hortalizas como cebollas y brócoli y otros alimentos como el té verde, en donde son responsables en gran parte de su astringencia. (Arias, M.M.,2011).

Los flavonoides de mayor importancia en los alimentos es el de los flavonoles, siendo la quercetina que se encuentra en la cebolla, miel, manzana, brócoli, cerezas, uvas, col, col de Bruselas, espinacas, habas, el kamferol en fresas, puerro brócoli, rábano, remolacha y la miricetina en uvas. Dada su capacidad de capturar radicales libres y de crear complejos con los iones metálicos, tienen una actividad antioxidante muy alta.(Arias, M.M.,2011)

Antocianinas, estas cuyo nombre proviene del griego anthos, flor y Kyanos, azul. Se consideran una subclase de los flavonoides, también se conocen como flavonoides azules. Son compuestos vegetales no nitrogenados pertenecientes a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza. A pesar de contener pocos grupos cromóforos, se han identificado 300 de estos compuestos, que son responsables de una gama muy amplia de colores, desde el incoloro hasta el púrpura. Producen colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y otros productos de origen vegetal, principalmente frutas o piel. Generalmente se encuentran en la cáscara o piel, como en el caso de las peras y las manzanas, pero también se pueden localizar en la parte carnosa, como en las fresas y las ciruelas.(Arias, M.M., 2011)

Betalainas, son un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, derivados de la 1,7-diazohepta metina, y que se han dividido en dos grandes clases: los rojos o betacianinas, y los amarillos o betaxantinas.

Son parecidas a los antocianinos y flavonoides en apariencia visual, anteriormente se las llamaba antocianinas nitrogenadas.(Arias, M.M., 2011).



Las betalainas, al igual que las antocianinas, se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutos y hojas que los sintetizan, principalmente en la epidermis y subepidermis.

De las fuentes de betalainas, sólo el betabel, el amaranto y los frutos de cactáceas (tunas rojas, pitaya, garambullo, fiotilla), son productos alimentarios. En el betabel, la betalaína corresponde a un 75-95% de los pigmentos, los otros son isobetanina, prebetanina e isoprebetanina; los dos últimos son monoésteres sulfatados de la betanina e isobetanina respectivamente. La del amaranto (*Amaranthus tricolor*), amarantina, es una de las betacianinas que últimamente ha sido motivo de investigación, se ha usado en algunos países para colorear diversos alimentos.

Las betalainas son uno de los pigmentos autorizados como aditivos por la FDA que no necesita certificación; se comercializan como polvo de betabel, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares y proteínas y antioxidantes.

4.4. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS.

La evaluación de los compuestos bioactivos en una muestra que contengan estos, se basa en la capacidad antioxidante, mediante el método DPPH, (reactivo: 1,1 definil-2-picril-hidrazilo), fue propuesto por primera vez por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH^{*} para aceptar un átomo de hidrógeno (H^{*}) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1 definil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable, debido a la deslocalización de un electrón desapareado, sobre la molécula completa, por lo cual ésta no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La



deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso, típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm.

Otro método denominado ABTS (reactivo: ácido 2,2'-azino-bis-3-estibenzotrazolin-6-sulfónico); se basa en la generación del radical ABTS y constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras o mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metil mioglobulina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión en presencia o ausencia de antioxidantes.

Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidante (Rec, et al. 1999).

La tecnología mejorada para la generación del radical catión ABTS^{•+}, implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio. Se mide a 645 nm, y la adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^{•+} está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como el valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

Trolox (cuyo nombre en inglés es: 6-hidroxy-2, 5, 7, 8-tetrametychromon-2-carboxilic acid) es un análogo de la vitamina E, soluble en agua. En un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo.



La capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) en inglés se lee como equivalent antioxidant capacity, mide la capacidad antioxidante de una sustancia dada, en comparación con el estándar de trolox, medido en unidades llamados trolox equivalentes (TE). Por ejemplo micromol TE/100 g. Debido a las dificultades para medir componentes antioxidantes individuales de una mezcla compleja (como los arándanos o los tomates), Trolox equivalencia se utiliza como referencia para la capacidad antioxidante de una mezcla de este tipo. (Rec, et al.,1999)

4.5 VITAMINA C Ó ACIDO ASCORBICO

El ácido ascórbico tiene una estructura de lactosa. La acidez no se debe a un grupo carboxílico, sino a la posibilidad de que se ionice el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia.

Se sabe que es un compuesto polar con gran masa molecular 140 000, que le impide atravesar la membrana celular por simple difusión (Meléndez, A, 2002).

Las propiedades del ácido ascórbico o vitamina C, que junto a las vitaminas B pertenecen al grupo de hidrosolubles, son variadas y complejas, pues los investigadores informan, desde su descubrimiento en 1936, casi periódicamente sobre nuevas aplicaciones del ácido ascórbico, un alimento funcional, porque más allá de nutrir tienen efectos benéficos para la salud, tales como, su utilidad en la prevención de la formación de cataratas y en el riesgo de desarrollar degeneración macular en personas mayores o ancianas, al servir de coadyuvante en la fecundidad masculina, al apuntalar al sistema inmune contra los efectos del resfriado, asma, tabaco y contaminantes aéreos, también suprime la aparición de células leucémicas y el crecimiento del tumor rectal y cáncer de cérvix; en los diabéticos potencia la acción de la insulina y en el metabolismo de los carbohidratos



y acelera la curación de las heridas, ayuda en la formación de colágenos, puede reducir edemas, por su efecto de estimulación de la diuresis, es un potente neutralizador de venenos (mercurio, arsénico y toxinas bacterianas) y retarda el envejecimiento de la piel (Meléndez, A.2002).

4.5.1 DISTRIBUCION DE VITAMINA C EN LOS ALIMENTOS

La vitamina C o ácido ascórbico se encuentran en las frutas cítricas en mayor porcentaje y vegetales como las hortalizas y legumbres (Meléndez, A.2002).

4.5.2 IMPORTANCIA DE VITAMINA C EN LA DIETA

La importancia de la vitamina C o ácido ascórbico es tal que la mayoría de los mamíferos son capaces de sintetizarla, pero algunas especies, entre ellas el hombre, dependen de fuentes exógenas para obtenerla (Meléndez, A.2002).

El humano adquiere, de forma natural, vitamina C de los alimentos, el organismo no lo almacena, por tanto la biodisponibilidad sérica del ácido ascórbico está ceñida por la interacción entre absorción intestinal y excreción renal.

Las propiedades del ácido ascórbico son variadas y complejas referidas la mayoría de ellas al papel como antioxidante de las especies de oxígeno reactivos que se generan durante la respiración mitocondrial, que afecta irremediablemente al sistema inmunitario, circulatorio y respiratorio, visión, metabolismo, piel y a todas las células del organismo. De la complejidad funcional de la Vitamina C deriva la necesidad de mantener al día lo que se conoce de este nutriente.

El hombre que no consume vitamina C, pues el cuerpo no la puede producir, sufre irremediablemente de escorbuto, patología caracterizada por fragilidad de los vasos sanguíneos, daño del tejido conectivo, fatiga y finalmente muerte. Por otro lado, la



toxicidad del ácido ascórbico no es común porque el organismo no lo almacena, sin embargo no es prudente consumir suplementos liposolubles en cantidades superiores a 2000mg/día debido a que puede provocar malestar estomacal, diarrea, ataques de gota, empeorar la litiasis renal por cálculo de oxalato, generar daños genéticos (efecto oxidante en el ácido desoxirribonucleico ADN), e incluso provocar deterioro al corazón y otro órganos, debido a que el ácido ascórbico de los suplementos moviliza el hierro almacenado en el organismo (férrico) y lo convierte en la forma dañina (ferroso), que daña los órganos (Meléndez, A.2002).

4.5.3 METODO DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C

Para determinar la concentración de vitamina C o ácido ascórbico en una muestra que contenga éste se procede a una valoración redox (Meléndez, A. 2002).

El ácido ascórbico en presencia de iodo se oxida, siendo éste el oxidante para este proceso redox, que se obtiene al hacer reaccionar, lodato de potasio con loduro de potasio

El ácido ascórbico se oxida en presencia del exceso de iodo, produciendo el ácido deshidroascórbico, luego se añade yoduro de potasio para obtener yodo libre. Conocida la cantidad de yodo generada, se procede a valorar el exceso de iodo remanente, luego valorar el ácido ascórbico, con una solución de tiosulfato de sodio es decir se realiza una valoración en retroceso, utilizado indicador de almidón (Meléndez, A.2001).

4.6 CAROTENOIDES: DEFINICION

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de

geranil-geranilpifosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). (Meléndez, A.2002).

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que se encuentran en forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias; se conoce la existencia de más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo (Meléndez, A. 2002).

4.6.1 CLASIFICACION

En los carotenoides los átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas en ocasiones terminadas en anillos de carbono; a los carotenoides que contienen átomos de oxígeno se les conoce más específicamente como xantófilos; los restantes constituyen el grupo de los llamados carotenos(Meléndez, A. 2002).

Su color, varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentran directamente relacionado con su estructura, los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en su proceso denominado conjugación; mientras el número de dobles enlaces conjugados aumenta la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Por ejemplo el fitoeno que posee únicamente tres dobles enlaces conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y apareciendo por tanto incoloro a la vista. El licopeno compuesto que confiere el color rojo al tomate contiene once enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color verde (α -caroteno), amarillo (β -caroteno), y anaranjado (neurosporaxantina) (Meléndez, A.2002).



4.6.2 DISTRIBUCION Y ESTADO NATURAL

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en bacterias y muy pocos se han reportado en animales, (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamenco son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar y otros. En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento esencial de la dieta pues es precursor de la vitamina A.

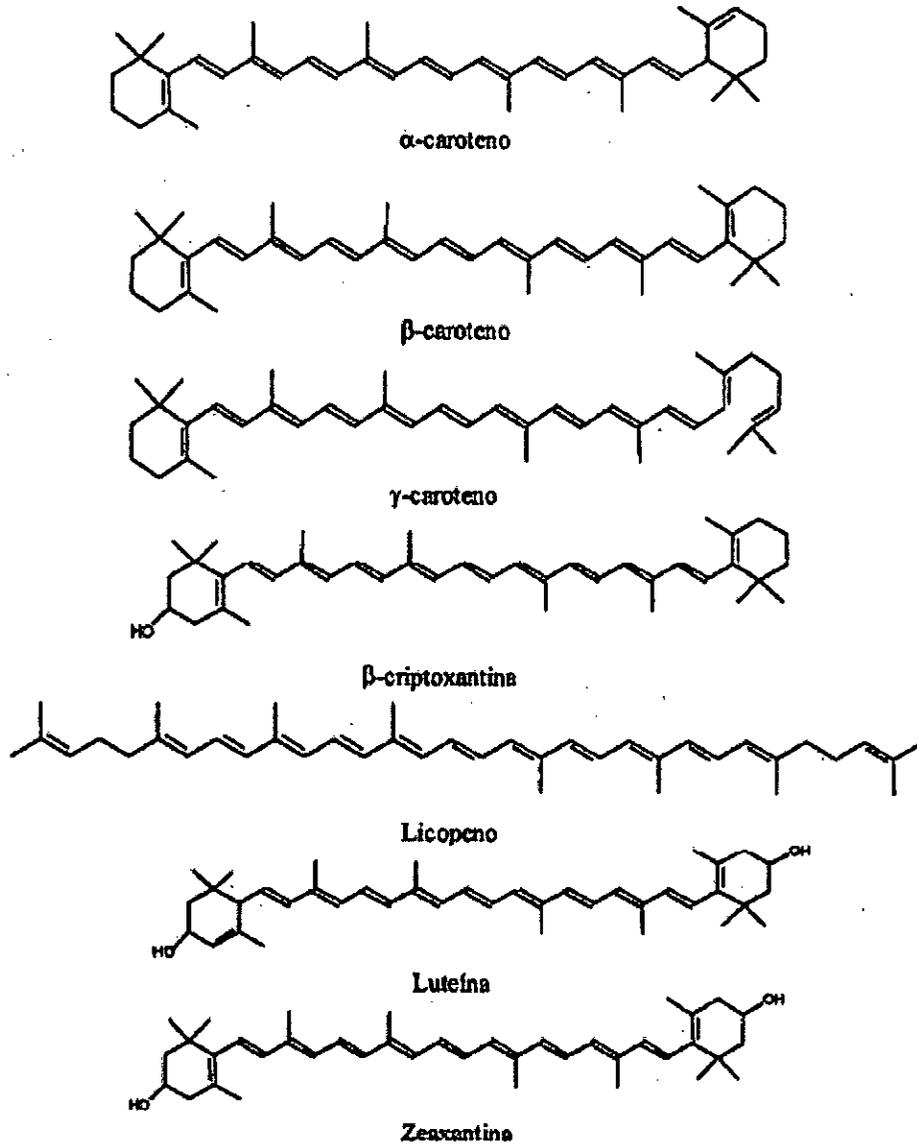
Se conocen más de 600 carotenoides, y se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glucósidos. Sin embargo los glucósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de éstos últimos es la crocina.

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, zanahorias). Se presenta a continuación las estructuras químicas de $\alpha - \beta - \gamma$ y caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (Meléndez, A.2002).



FIGURA 4.2

ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE α - β - γ CAROTENO, β -CRİPTOXANTINA, LICOPENO, LUTEÍNA Y ZEAXANTINA.



Fuente: Meléndez-Martínez - 2004.

Los carotenoides se encuentran en frutos y vegetales amarillos y en los cloroplastos de tejidos verdes, donde están enmascarados por la clorofila hasta que el tejido

envejece. El contenido en carotenoides de las frutas aumenta durante la maduración, si bien parte de la intensificación del color se debe a la pérdida de clorofila (Meléndez, A. 2002).

Hasta hace pocos años, gran parte de la importancia nutricional de éstos pigmentos ha radicado en el hecho de que algunos de ellos poseían actividad provitamina A, si bien recientemente se ha puesto de manifiesto que la relevancia de estos compuestos va más allá, al haberse demostrado que juegan un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas.

4.6.3 DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN LOS ALIMENTOS

Los carotenoides están ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Es en los vegetales donde se encuentran en mayor concentración y variedad, aunque también se encuentran en bacterias, algas, hongos, así como en animales, si bien estos no pueden sintetizarlos. Se estima que en la naturaleza se producen anualmente más de 100 000 000 de toneladas de carotenoides; la mayor parte de esta cantidad se encuentra en forma de fucoxantina (en diversas algas) y en los tres principales carotenoides de las hojas verdes: luteína, violaxantina y neoxantina; en algunas especies como *Lactuca sativa*, la lactucaxantina es un pigmento mayoritario, se presenta a continuación la distribución de carotenoides en diversos alimentos (Meléndez, M.A. 2002).



CUADRO 4.3

DISTRIBUCIÓN DE CAROTENOIDES EN DIVERSOS ALIMENTOS

Alimento	Carotenoides Mayoritarios
Zanahoria (<i>Daucuscarota</i>)	α - β -caroteno
Naranja (<i>Citrussinensis</i>)	Violaxantina, β - criptoxantina, luteína, zeaxantina
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Violaxantina, β -caroteno
Tomate (<i>Lycopersicomesculentum</i>)	Licopeno
Pimiento rojo (<i>capsicumannuum</i>)	Capsantina, capsorrubina
Melocotón (<i>Prunuspersica</i>)	β -criptoxantina, luteína
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	β -criptoxantina, β -caroteno
Guayaba (<i>Psidiumguajava</i>)	Licopeno, β -caroteno
Ciruela (<i>Spondiaslutea</i>)	β -criptoxantina

Fuente: Meléndez-Martínez, Antonio. Área de Nutrición y Bromatología.

Universidad de Sevilla. España 2002.

La distribución de carotenoides entre los distintos grupos de plantas no presenta un patrón único; en verduras, el contenido en carotenoides sigue el modelo general de los cloroplastos de todas las plantas superiores, siendo generalmente luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina, en este orden, los mayoritarios. En



pequeñas cantidades se encuentran zeaxantina, β -caroteno, β -criptoxantina y anteraxantina (Meléndez, M.A. 2002).

En frutos, las xantofilas suelen encontrarse en mayor proporción, aunque en algunos casos, los pigmentos mayoritarios son carotenos, como es el caso del licopeno del tomate (Meléndez, M.A. 2002).

A veces, en ciertos frutos ocurre que algún carotenoide, además de ser mayoritario, se limita a una sola especie de plantas. La capsantina y capsorrubina se encuentran casi exclusivamente en frutos del género *Capsicum* y son los principales pigmentos que dan color al pimiento rojo, se debe tener en cuenta que el patrón de carotenoides en un mismo fruto varía en función de factores como la variedad y las condiciones climáticas entre otros (Meléndez, M.A. 2002).

En los animales, los carotenoides son incorporados a través de la dieta y se almacenan en el tejido adiposo sin transformarse. La yema de huevo debe su color a dos xantofilas, luteína y zeaxantina, y a trazas de β -caroteno, mientras que la astaxantina es responsable del color rosado de la carne del salmón. En ocasiones, algunos carotenoides como la astaxantina, se unen a proteínas originando unos compuestos conocidos como carotenoproteínas, lo cual ocurre en algunos crustáceos; estos confieren a estos animales colores verdosos o azulados, si bien cuando estos complejos se desnaturalizan durante la cocción se pone de manifiesto el color rojo del carotenoide (Meléndez, M.A. 2002).

4.6.4 IMPORTANCIA DE CAROTENOIDES EN LA DIETA

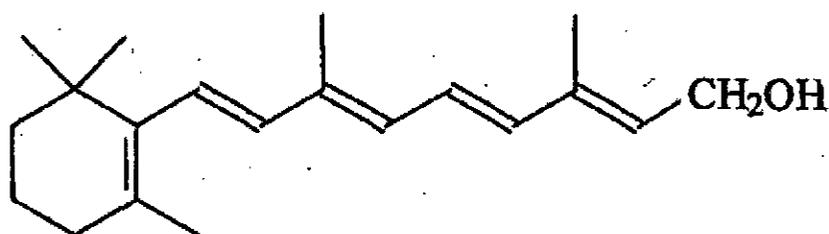
Además de la contribución de los carotenoides al color atractivo de las frutas y verduras, destaca, por su importancia a nivel fisiológico y dietético, la propiedad de algunos de ellos de tener actividad como pro vitamina A (Meléndez, M.A. 2002).



La vitamina A es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sanos la piel y los tejidos superficiales. Puede aportarse como tal vitamina, llamada retinol, cómo algunos análogos menos activos, o como sus precursores, los carotenoides. El retinol es un alcohol cíclico, insaturado, de veinte átomos de carbono, compuesto por un núcleo de β -ionona y una cadena lateral insaturada; en la molécula de retinol existen cinco dobles enlaces conjugados, incluido el doble enlace del anillo de β -ionona que está conjugado con los de cadena lateral, a continuación se presenta la estructura del retinol (Meléndez, M.A. 2002).

FIGURA 4.3

ESTRUCTURA DEL RETINOL



Fuente: Melendez, M.A. 2002.

No todos los carotenoides son precursores de la vitamina A, por lo que se divide en dos grandes grupos: provitamínicas y no provitamínicas. El número de carotenoides precursores de vitamina A oscila entre 50 y 60, destacando los carotenos (α - β - γ -caroteno) y algunas xantofilas (β -criptoxantina) (Meléndez, M.A. 2002).

La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A depende de la conversión en retinol por los animales, así como de la presencia de β -ionona. Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de β -ionona pueden convertirse en retinol en los animales; de esta forma, el carotenoide más importante al respecto

es el β -caroteno, que contiene 2 de estos anillos; el α y el γ -caroteno pueden convertirse en retinol en los animales con la misma eficacia que el β -caroteno, ya que el anillo del α -caroteno, no puede convertirse en el organismo en γ ionona, y la estructura abierta de la cadena del γ -caroteno no puede hacerse cíclica en los animales. Últimamente los carotenoides están suscitando un gran interés debido a una serie de estudios que demuestran su actividad antioxidante (Meléndez, M.A. 2002).

La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración cis o trans, etc.) su concentración, la presión parcial del oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E.

Existen estudios que relacionan la aparición de algunos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, por lo que son considerados compuestos anticancerígenos, varias investigaciones epidemiológicas han mostrado que el riesgo de padecer cáncer es inversamente proporcional al consumo de vegetales y frutas ricos en carotenoides (Meléndez, M.A. 2002).

4.7 EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides debido a su alta conjugación de dobles enlaces presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire; la luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo isomerismocis y trans) es un factor a considerar al momento de realizar la extracción (Meléndez, M.A. 2002).

El calor también favorece reacciones térmicas de degradación, el aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido,



hidróxidos y peróxidos, entre otros. Por las razones expuestas se debe preferiblemente realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros; y que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua, la cual dificulta una extracción eficiente, conviene eliminar dicha agua (Meléndez, M.A. 2002).

Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración; una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire (Meléndez, M.A. 2002).

Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de solución de KOH al 60% etanólico, esta mezcla se deja en la oscuridad durante la noche, a temperatura ambiente y con agitación magnética, con lo cual los carotenoides son liberados.

Las mezclas de carotenos y las xantofilas mono y dihidroxiladas pueden separarse agitando una solución en éter de petróleo con un volumen de metanol al 90%; las xantófilas dihidroxiladas quedan en la fase metanólica, las monohidroxiladas y los carotenos quedan en la fase etérea.

Debido a que los extractos de carotenoides generalmente están impurificados por otras sustancias como los esteroides, estos se pueden eliminar dejando el extracto concentrado en solución de éter etílico, tapado y a -10°C durante la noche, de esta



manera los esteroides se precipitan y pueden ser retirados por centrifugación o filtración (Meléndez, M.A. 2002).

4.8. METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES

4.8.1. EVOLUCIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

En el análisis de los carotenoides presentes en los alimentos, especialmente en los productos vegetales, dos actividades analíticas distintas pueden ser citadas: a) dilucidación de las estructuras de los carotenoides desconocidos, y b) determinación de la composición. Los químicos orgánicos y bioquímicos están involucrados en la primera actividad. En éste, el principal interés es obtener el carotenoide puro y sin alteraciones, el criterio de pureza es riguroso, pero se toleran pérdidas cuantitativas. Para la dilucidación de estructuras de los carotenoides desconocidos, los analíticos recurren los técnicos como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la espectrometría de masas. Los científicos de alimentos y nutricionistas están interesados en la segunda actividad para la cual el requerimiento de pureza no es tan estricto, pero se necesita una extracción completa, separación eficiente, identificación conclusiva y una cuantificación exacta. En ambos casos, son esenciales precauciones severas para proteger a los carotenoides de la oxidación, isomerización (Rodríguez – Amaya, 1993).

Con los diversos roles atribuidos a los carotenoides, el análisis cuantitativo ha sido aproximado en muchas formas, dependiendo del objetivo del analista. Los carotenoides se estudiaron inicialmente debido a su color, por lo tanto el contenido de carotenos totales fue determinado simplemente por extracción, medida



espectrofotométricamente y cálculo, basado en el coeficiente de absorción del β -caroteno o de aquel carotenoide principal (Rodríguez-Amaya,1993).

El contenido de carotenoides totales también fue usado para estimar el valor de vitamina A de los alimentos. Sin embargo, temprano se comprendió que grandes cantidades de carotenoides sin actividad de provitamina A estaban presentes en muchos alimentos. Por lo tanto se propusieron métodos que involucran la separación de la fracción de los "carotenos" por cromatografía de columna abierta (columna clásica de flujo por gravedad). El más conocido de estos métodos es el de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) introducido en su forma presente en 1955. La fracción de "carotenos" eluída a partir de una columna MgO: Hyflosupercel se asume β -caroteno. Sin embargo, esta fracción puede contener cantidades considerables de otros carotenoides provitamina A, obviamente con actividad menor, junto con otros carotenoides desprovistos de actividad de provitamina A, por lo tanto, el valor de vitamina A podría ser ampliamente subestimado (Rodríguez-Amaya,1993). Según Wills et al (1984), Mercadante y Rodríguez-Amaya (1989-1991) con el ajuste correcto de las fases estacionario y móvil, la cromatografía de columna abierta puede ser utilizada para separar y cuantificar las provitaminas individualmente.

Con la introducción de la tecnología de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC (High Performance Liquid Chromatography), la investigación en los carotenoides de los alimentos ha sido intensificada en los últimos años. Muchos científicos han investigado en los últimos años la separación de las provitaminas o de los carotenoides en general. Sin embargo, incluso con esta poderosa técnica pronto se volvió evidente que ningún sistema por sí solo es aplicable a diferentes



muestras de alimento y es capaz de separar todos los carotenoides en una sola corrida. El análisis cuantitativo es acosado por varios problemas: a) los carotenoides absorben máximamente a diferentes longitudes de onda; b) sus coeficientes de absorción difieren; c) los efectos de solvente pueden ser sustanciales, d) los estándares son inestables, de pureza variable y comercialmente no están disponibles para la mayoría de los carotenoides. El procedimiento más simple de cuantificación, el cálculo de los porcentajes de área, por lo tanto, sólo se puede tomar como un método que brinda resultados aproximados. Se requiere de una estandarización externa e interna para obtener las concentraciones absolutas, sin embargo, la necesidad de estándares confiables complica el procedimiento (Rodríguez – Amaya, 1993).

4.8.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA – VISIBLE (UV-VIS).

Esta técnica involucra el uso de un instrumento de laboratorio que mide el grado de absorción de luz de una muestra. El diseño del instrumento es tal que una longitud de onda monocromática de luz proveniente de una fuente de luz (dentro del instrumento) índice a través de una solución de muestra. La cantidad de luz absorbida por esta solución es medida electrónicamente por un tubo fotomultiplicador y visualizada en un dispositivo de lectura. El analista es capaz de cuantificar un constituyente en la muestra relacionando este grado de absorbancia mostrado por el instrumento en la concentración del constituyente (Kenkel, 1992). Además de este análisis cuantitativo, también se puede realizar un análisis cualitativo observando el patrón de absorción que una muestra exhibe a lo largo de un rango de longitudes de onda, lo que se conoce como “espectro de absorción molecular”. En teoría los patrones de absorción de dos especies químicas

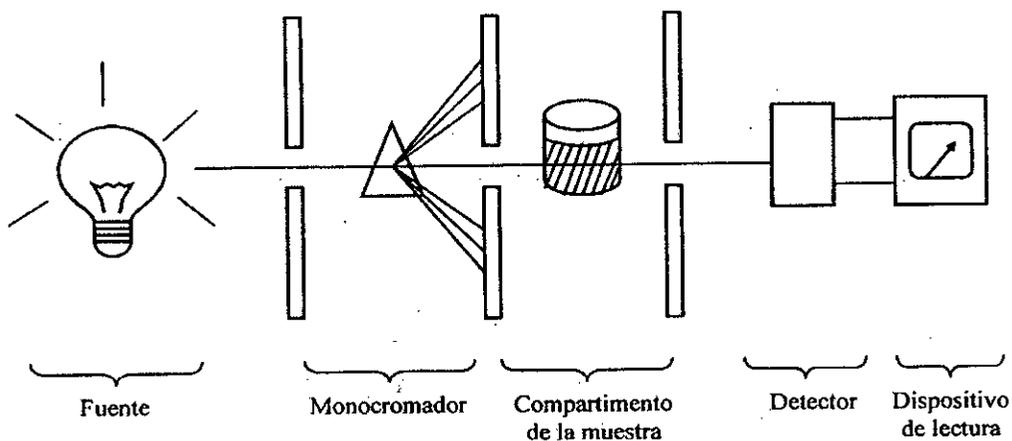


diferentes no son exactamente iguales. Por lo tanto, se podría decir que se tiene una "huella digital" molecular y esto es lo que hace que la identificación o análisis cualitativo sea posible (Kenkel, 1992).

El instrumento moderno es capaz de llevar tanto el análisis cualitativo como el cuantitativo (Kenkel, 1992). En la figura 1 se muestran los componentes básicos de un espectrofotómetro. La fuente de luz (poli cromática) proporciona la luz que va a ser dirigida a la muestra.

El selector de longitud de onda o monocromador, aísla la longitud de onda que va a ser usada. El compartimiento de la muestra es una "caja" estrecha donde se sostiene la solución de la muestra y los componentes del detector / lector son los módulos electrónicos, los cuales miden y muestran el grado de absorción (Kenkel, 1992).

FIGURA 4.4
COMPONENTES BÁSICOS DE UN ESPECTROFOTÓMETRO.



Fuente: Kenkel, 1992.

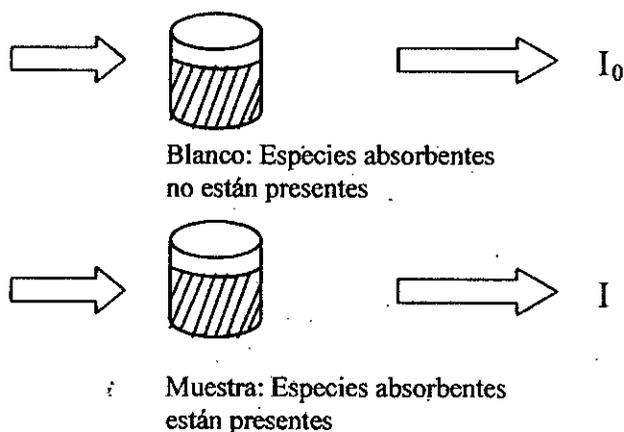
4.8.2.1. EL CONCEPTO DE ABSORBANCIA

La intensidad de luz que golpea al detector cuando una solución "blanco" está presente en la cubeta se le da el símbolo de " I_0 ". El blanco es una solución que contiene todas las especies químicas que estarán presentes en los estándares y en las muestras que será medidas (a los mismos niveles de concentración), excepto por la especie analítica (Kenkel, 1992).

Una solución de este tipo no deben mostrar absorción y por lo tanto I_0 representa la intensidad máxima que puede golpear al detector en cualquier momento. Cuando el blanco es reemplazado por una solución del analito, se detectará un haz de luz menos intenso. La intensidad de la luz para esta solución es denotada por el símbolo I (Figura 2). Por lo tanto la fracción de luz transmitida de I/I_0 . Esta fracción es definida como la "transmitancia" " T " (Kenkel 1992).

FIGURA 4.5

ILUSTRACIÓN DE LAS DEFINICIONES DE I E I_0



Fuente: Kenkel, 1992.

Entonces $T = I/I_0$. El porcentaje de transmitancia es similarmente definido: $\%T = T \times 100$. El aspecto infortunado de la transmitancia es que no es lineal con la concentración, concentraciones bajas resultan transmitancias altas y concentraciones altas producen bajas transmitancias. Sin embargo, la relación no es lineal sino logarítmica. Debido a que la relación es logarítmica, se espera que el logaritmo de la transmitancia sea lineal.

Por lo tanto, se definió el parámetro de "absorbancia" como el logaritmo negativo de la transmitancia y se le dio el símbolo "A".

$$A = -\log T$$

Entonces la absorbancia es un parámetro que aumenta linealmente con la concentración (Kenkel, 1992).

4.8.3. CROMATOGRAFIA

4.8.3.1 ASPECTOS GENERALES

La cromatografía puede ser considerada como la separación de los componentes de una mezcla basada en los diferentes grados de interacción de estos componentes en dos fases materiales separadas. La naturaleza de las dos fases y el tipo de interacción pueden variar, y esto da origen a los diferentes "tipos" de cromatografía. Una de las dos fases, es una fase en movimiento (la fase "móvil") mientras que la otra no se mueve (la fase "estacionaria"). La mezcla que va a ser separada usualmente se introduce en la fase móvil, la cual se hace mover o filtrar a través de la fase estacionaria ya sea por gravedad o por cualquier otra fuerza. Los componentes de la mezcla son atraídos y retardados por la fase estacionaria



en grados variables, y como resultado, se mueven junto con la fase móvil a velocidades diferentes y por lo tanto son separados (Kenkel, 1992).

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Un esquema de clasificación está basado en la naturaleza de las dos fases. Todas las técnicas que utilizan un gas como fase móvil, viene bajo el encabezamiento de "Cromatografía de Gas" (GC). Todas las técnicas que utilizan una fase móvil líquida vienen bajo el encabezamiento de "Cromatografía Líquida" (LC). Adicionalmente, se tiene cromatografía gas-líquido (GLC), cromatografía líquido-sólido (LSC) si queremos estipular la naturaleza de la fase estacionaria así como la de la fase móvil. Sin embargo, es más útil clasificar las técnicas de acuerdo a la naturaleza de la interacción de los componentes de la mezcla con las dos fases. Estas clasificaciones se pueden denominar como "tipos" de cromatografía. Los tipos de cromatografía más importantes son: partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión por tamaño (Kenkel, 1992).

4.8.3.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia "*High Performance Liquid Chromatography*" (HPLC), es un método de cromatografía instrumental en el cual la fase móvil es líquida. Todos los tipos de cromatografía líquida pueden ser utilizados en la configuración del HPLC. Por lo tanto existen HPLC de partición (LLC), adsorción (LSC), fase enlazada (BPC), intercambio iónico (IEC) y exclusión por tamaño, incluyendo permeación en el gel (GPC) y filtración en gel (GFC) como tipos de HPLC comúnmente usados. El HPLC involucra el flujo a alta presión de una fase móvil líquida a través de un tubo de metal (columna) que contiene la fase

estacionaria, con una detección electrónica de los componentes de la mezcla que ocurre al final del efluente. La alta presión que frecuentemente alcanza 4000 a 6000 psi es derivada de una bomba especial libre de pulsaciones (Kenkel, 1992).

El aumento en popularidad del HPLC se debe en gran parte a las ventajas ofrecidas por esta técnica sobre el método de columna abierta clásico, más antiguo. La ventaja más obvia es la velocidad. Los procedimientos de separación y cuantificación que requieren horas o hasta veces días con el método de columna abierta, pueden ser completados en cuestión de minutos con el HPLC. La tecnología de columnas modernas y sistemas de elusión de solventes por gradiente, han contribuido significativamente con esta ventaja permitiendo que muestras extremadamente complejas puedan ser resueltas con facilidad en un tiempo muy corto (Kenkel, 1992).

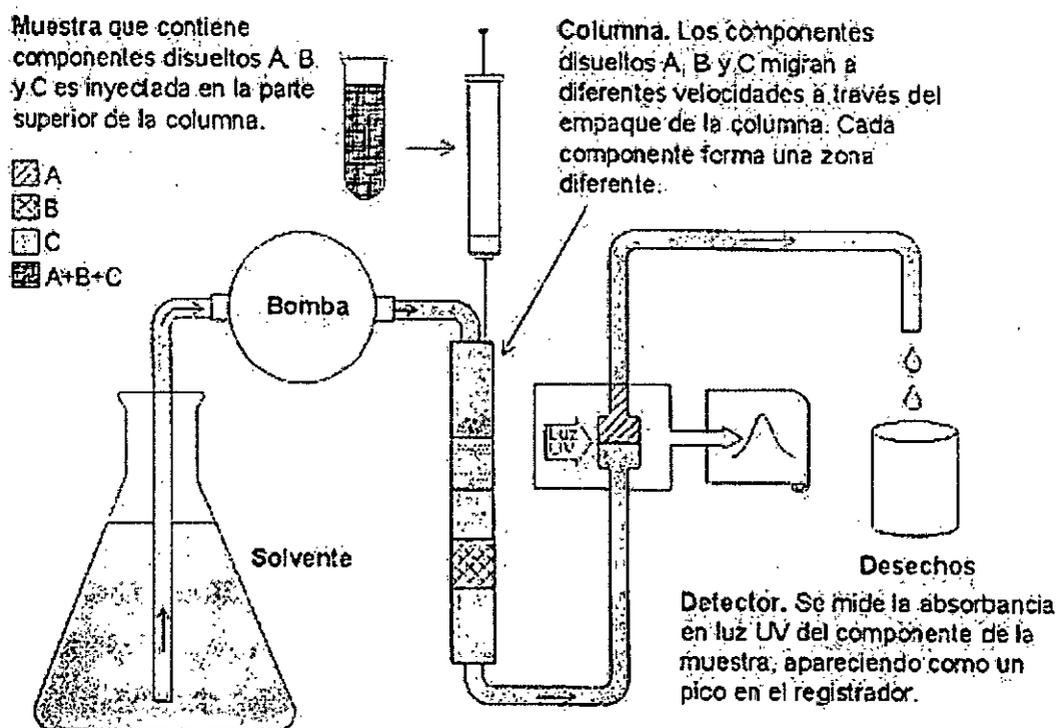
El sistema básico de HPLC consiste de: un reservorio para el solvente (fase móvil), bomba, dispositivo de inyección, columna y detector (Figura 6). La bomba arrastra la fase móvil del reservorio y la bombea a través de la columna. En la cabeza de la columna está el dispositivo de inyección, el cual introduce la muestra al sistema. Al final del efluente, un detector detecta los componentes de la muestra y la señal resultante es exhibida como picos en un registro gráfico en papel. Además de estos componentes básicos, una unidad de HPLC puede estar equipada con un programador de gradiente, un "automuestreador", una columna de protección "*guardcolumn*", varios filtros en línea y un integrador computarizado u otro sistema de manejo de datos (Kenkel, 1992).



FIGURA 4.6

SISTEMA BÁSICO DE HPLC

(CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA)



Fuente: Kenkel 1992.

V MATERIALES Y METODOS

5.1 MATERIALES Y REACTIVOS

a) MATERIALES

Crisoles

Bureta

Pipeta

Placas Petri

Tubos de ensayo

Matraz

Papel de filtro

Balón de Kjeldalh

Cartucho de celulosa

Embudo de separación

Soporte universal

Vasos de precipitado

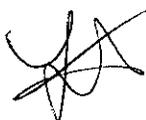
Pipetas volumétricas

Lunas de reloj

Pinzas para bureta

Frascos de vidrio

Crisoles de porcelana



b) REACTIVOS

Solución de ácido clorhídrico

Solución de hidróxido de calcio

Solución de ácido sulfúrico

Hexano

Éter de petróleo

Acetona

Metanol

Solución de sulfato de cobre

Solución de sulfato de potasio

Solución de iodato de potasio

Solución de ioduro de potasio

Solución de tiosulfato de sodio

Solución de almidón

DPPH (1,1 difenil -2- picril-hidrazilo)

ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Persulfato de potasio de grado analítico

Carbonato de sodio anhidro

(+) – ácido ascórbico para análisis

Ácido metafosfórico

Ácido acético glacial

Ácido cítrico

Etanol

Hidroquinona

c) EQUIPOS

Mufla

Desecador

Estufa

Balanza analítica

Equipo de destilación

Equipo Soxhlet

Espectrofotómetro

Balanza analítica marca Mettler

Potenciómetro

Equipo de absorción atómica

5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población la constituye la mashua en sus diversas variedades de las serranías andinas de nuestro Perú. La muestra con la que se trabajó fue de 5kg, las de color amarillo debido a que posee carotenoides, vitamina c y compuestos fenólicos.

5.3 TECNICA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE MASHUA

Para la obtención del extracto de mashua en el laboratorio se optaron los pasos siguientes:

- Selección de los tubérculos de mashua sanos y sin magulladuras
- Se pesó 5kg de tubérculos de mashua
- Lavado de los tubérculos de mashua con agua destilada.



- Trozado de los tubérculos de mashua
- Licuado
- Filtrado
- Homogenizado con agitador magnético por 15 minutos.
- Centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm
- Extracto libre de precipitados

5.3.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE MASHUA

Para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante con los métodos DPPH y ABTS: se tomó 2,5g del extracto y se agregó 12,5mL de metanol, se homogenizó durante 15 minutos con agitador magnético y se almacenó durante 24 horas a 4°C en oscuridad, luego se procedió a centrifugar el homogenizado durante 20 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se guardó para análisis posteriores y el precipitado se eliminó.

Para los ensayos según el método DPPH, se tomó alícuotas del extracto obtenido igual a 150mL:

Para los ensayos según el método ABTS se tomó 50mL.

- **Ensayo y determinación de la actividad antioxidante (A A) por el método DPPH (Murillo et al 2007)**
- Se prepara solución del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidroxi (DPPH[•]) de 20mg/L en metanol grado analítico.
- En tres tubos de ensayo se agregan 0,25mL del extracto a evaluar
- Se homogeniza y se incuba en oscuridad por 30 minutos.



- Se mide la absorbancia de la solución en el espectrómetro a 515 nm
(A_{extracto})
- Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; como control negativo ($A_{\text{control (-)}}$) se tomó el sistema de disolución correspondiente.
- Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo usado para los extractos; además se mide el control fotométrico preparado a partir de 1,25mL de metanol para descartar la absorbancia de este solvente.
- El blanco de los extractos fue preparado a partir de 0,25mL de extracto y 1mL de metanol, esta solución fue medida a 515 nm de longitud de onda.
- **Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS⁺ (Mathew et al. 2005)**
- Se prepara solución del reactivo ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotrazolin-6-sulfónico) pesando 77,6mg y disolviendo en 20mL de agua destilada para obtener una concentración de 7mM.
- Se prepara una solución de persulfato de potasio de concentración 2,45mM.
- Se agrega la solución de persulfato de potasio al reactivo ABTS⁺, se homogeniza y se incuba por 16 horas a temperatura ambiente.
- Se diluye la solución de ABTS⁺ en etanol absoluto hasta una absorbancia de $0,7 \pm (0,02)$ a 732 nm.
- Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona 1000 $\mu\text{g/mL}$; como control negativo ($A_{\text{control (-)}}$) se usó el sistema de disolución correspondiente.



- Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo utilizado en la medición del extracto.
- Adicional a esto se midió el control fotométrico preparado a partir de 2mL de etanol – agua (1:1) para descartar la absorbancia del solvente en las mediciones.
- El blanco de los extractos se preparó a partir de 50µL del extracto y 1450µL de la mezcla agua-etanol (1:2). Esta solución fue medida a 732 nm de longitud de onda ($A_{\text{Blanco extracto}}$).
- Se adiciona 50 µL de la solución de extracto a las concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 µg/mL en tres tubos de ensayo.
- Agregar 1450 µL de solución ABTS⁺ preparada previamente a los tres tubos que contienen el extracto a evaluar.
- Se homogeniza y se deja reaccionar por 30 minutos en oscuridad.
- Medir la absorbancia de las soluciones a 732 nm de longitud de onda.

La capacidad captadora de radicales libres (% de actividad antioxidante) se calculará con la misma ecuación para el ensayo DPPH y es la siguiente:

$$\% \text{ Actividad Antioxidante (A A)} = \left[\frac{A_{\text{control}(-)} - (A_{\text{extracto}} - A_{\text{blanco extracto}})}{A_{\text{control}(-)}} \right] \times 100$$

Donde:

A_{extracto} :

Absorbancia de los extractos.

$A_{\text{blanco extracto}}$:

Absorbancia del blanco de los extractos.

$A_{\text{control}(-)}$:

Absorbancia del control negativo.



CUADRO 5.1
EL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A DIFERENTES
CONCENTRACIONES TROLOX.

Concentración Trolox (μM)	% A A
1	0
2	0,80
4	3,35
8	6,02
16	14,85
32	28,91

Fuente: Murillo et al 2007

5.3.2 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA

5.3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Según el método AOAC Official Method 930.04:1995 (The Association of Official Analytical Chemist) y AOAC Official Method 920.36:1995.

5.3.2.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Según el método AOAC Official Method 930.05:1995 y AOAC Official Method 920.09:1995

5.3.2.3 DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA

Según el método AOAC Official Method 930.10:1995 (The Association of Official Analytical Chemist) y AOAC Official Method 920.09:1995

5.3.2.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Según el método AOAC Official Method 984.13:1995 (The Association of Official Analytical Chemist)

5.3.2.5 DETERMINACIÓN DE GRASAS

Según el método AOAC Official Method 930.09:1995 (The Association of Official Analytical Chemist) conocido como método Soxhlet.

5.3.2.6 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

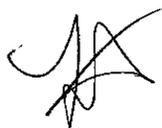
El término carbohidratos total es definido por Agriculture Handbook del USDA, Composición de los Alimentos (1975), como el valor obtenido restando de 100 la suma del contenido de humedad, cenizas, proteína y grasas.

5.3.3 ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL PRODUCTO OBTENIDO: EXTRACTO DE MASHUA

5.3.3.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

En un crisol previamente pesado se introduce 3.0 g de extracto de mashua, y se coloca en la estufa a 90°C durante 80 minutos, luego se transfiere a un frasco desecador, hasta temperatura ambiente y se pesa inmediatamente obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso del residuo (g)} \times 100 \text{ de muestra}}{\text{Peso de la muestra en (g)}}$$



5.3.3.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Se pesa 3.0 g de extracto de mashua en un crisol de porcelana y luego se coloca en una mufla a una temperatura de 600°C, durante 2 horas, transcurrido el tiempo se transfiere a un frasco desecador hasta temperatura ambiente y se pesa de inmediato, obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso del residuo (g)} \times 100 \text{ de muestra}}{\text{Peso de la muestra en (g)}}$$

5.3.3.3 DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA

Se pesa 3.0 g de extracto de mashua y se transfiere a un matraz y se agrega 200 mL de solución de ácido sulfúrico al 1,25 % en peso y se hierve durante 30 minutos, se filtra y se lava con agua destilada. Al residuo obtenido se añade 200 mL de solución de hidróxido de sodio al 1,25 % en peso hirviéndose por 30 minutos, se filtra al vacío, lavando con agua destilada hasta eliminar la reacción alcalina. El residuo obtenido se incinera en la mufla a 600°C durante 1 hora, y una vez enfriado en el frasco desecador a temperatura ambiente, se pesa; obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{W_1 \text{ (g)} - W_2 \text{ (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

Dónde: W_1 = Peso de fibra + minerales

W_2 = Peso residuo incinerado



5.3.3.4 DETERMINACION DE PROTEINAS

Se pesa 4.0 g de extracto de mashua y se introduce en un balón Kjeldhal y se agrega 1.0 g de sulfato de cobre anhidro, más 15,0 g de sulfato de potasio, más 25 mL de solución de ácido sulfúrico concentrado.

Se calienta el balón hasta ebullición, hasta la aparición de vapores blancos, se agita suavemente y continua el calentamiento por 90 minutos. Se enfría y se agrega 200 mL de agua destilada y se añade 100 mL de una solución de hidróxido de sodio 0,1N.

Se conecta el balón al bulbo del refrigerante que este sumergido en 50 mL de solución de ácido clorhídrico 0,1N, se calienta hasta ebullición y se obtiene 150 mL de destilado.

Se titula el destilado con solución de ácido clorhídrico 0,1N, usando anaranjado de metilo como indicador, obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{mLHCl gastados} \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{\text{Peso de muestra}}$$



5.3.3.5 DETERMINACION DE GRASAS

Se pesa 6.0 g de extracto de mashua y se coloca en un depósito dentro de un cartucho de celulosa que sirve como filtro; se extrae durante 4 horas en un extractor Soxhlet y luego se destila para recuperar el solvente (hexano), obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{Peso de grasa (g)} \times 100}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

5.3.3.6 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

El término carbohidrato total es definido por Agriculture Handbook de USDA, Composición de los Alimentos (1975), como el valor obtenido restando de 100, la suma del contenido de humedad; cenizas, proteína y grasas.

5.3.4 DETERMINACION DEL ACIDO ASCORBICO

Se ha seguido el método de valoración por retroceso propuesto por Meléndez, A. 2002 y consiste en los pasos siguientes:

- Se miden 3 mL del extracto de mashua y se coloca en un matraz erlenmeyer.
- Se añade 20 mL de solución de iodato de potasio 0,01 M, más 20 mL de ioduro de potasio 0,01 M, más 3 mL de ácido clorhídrico concentrado, más solución de almidón recientemente preparado.
- Se valora el iodo presente en el matraz con solución de tiosulfato de sodio 0,01M.



5.3.5 EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES

Para extracción de los carotenoides se ha seguido la tecnología propuesta por Safo-Katanga (1984), modificada por Bedoya (1999) y consiste en los pasos siguientes:

- Se pesaron 5 g de extracto de mashua
- Se adicionó 5 mL de éter de petróleo y 5 mL de acetona
- Se homogenizó durante 10 minutos
- Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos
- Se extrajo la fase etérea
- Se reextrae el residuo con 5 mL de éter de petróleo y 5 mL de acetona
- Se homogenizó durante 5 minutos
- Se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos
- Se extrajo la fase etérea y se mezcló con la anterior
- Se completó a volumen final a 15 mL con éter de petróleo y se leyó inmediatamente en el espectrofotómetro

5.3.6 CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES POR EL METODO COLORIMETRICO

Para la cuantificación de los carotenoides se ha usado el espectrofotómetro de ultravioleta-visible y consiste en los pasos siguientes:

- Fijar absorbancia para una longitud de onda de 450 nm
- Medir blanco usando éter de petróleo como referencia



- Medir absorbancia de la muestra
- Calcular el contenido de carotenoides usando la formula siguiente

$$\mu\text{g/g} = (A \times \text{Volumen final} \times 10^4) / (A_{1\text{cm}-1\%}) \times \text{peso de muestra}$$

Donde:

- $\mu\text{g} / \text{g}$ = Microgramos de carotenoides / gramo de muestra
- A= Absorbancia a 450 mm
- Volumen final. = Volumen en mL de la solución antes de la lectura.
- $A_{1\text{cm}-1\%}$ = Coeficiente de absorbancia del β - caroteno en éter de petróleo = 2592
- Peso de la muestra en gramos.
- Comparar el espectro de la muestra con el espectro del estándar β -caroteno puro



VI RESULTADOS

6.1 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados obtenidos del estudio de la materia prima: La mashua

(Tropaeolum tuberosum.) son:

6.2 COMPOSICIÓN DE LA MASHUA (TROPAEOLUM TUBEROSUM.)

CUADRO 6.1

ANALISIS PROXIMAL DE LA MASHUA

CONCEPTO	PROMEDIO % EN PESO
Humedad	84,43
Cenizas	0,56
Fibra bruta	0,58
Proteínas	1,52
Lípidos	0,28
Carbohidratos	12,93

Fuente: Datos experimentales.

6.3 CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C EN LA MASHUA (TROPAEOLUM TUBEROSUM.)

CUADRO 6.2

ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C EN LA MASHUA

COMPONENTE	CONTENIDO
Acido ascórbico mg/100g	77,5

Fuente: Datos experimentales.

**6.4 CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LA MASHUA
(TROPAEOLUM TUBEROSUM.)**

CUADRO 6.3

CAROTENOIDES TOTALES EN LA MASHUA

COMPONENTE	CONTENIDO
Carotenoides mg/100g	2,36

Fuente: Datos experimentales.

**6.5 CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MASHUA
(TROPAEOLUM TUBEROSUM.)**

CUADRO 6.4

COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MASHUA

COMPONENTE	CONTENIDO
Acido ascórbico o vitamina C (mg/100 g)	77,50
Carotenoides totales (mg β caroteno /100 g)	2,36
Compuestos fenolicos (mg Acido Clorogenico /100 g)	82,60
Capacidad Antioxidante (μ g eq trolox /100 g)	DPPH 258,95
	ABTS (lipofílica) 281,60
	ABTS (hidrofílica) 296,80

Fuente : Datos experimentales

VII DISCUSIÓN

- En el ítem 9.1 cuadro 9.1 del apéndice se presenta las características físicas de la mashua, cuya longitud promedio es de 10-14cm, ancho 3 a 4,5cm; y un peso promedio de 40g/ tubérculo.
- En el ítem 9.2 cuadro 9.2 del apéndice se presenta los grados Brix y pH de la mashua con valores de 8,5° Brix y pH de 6,2; pudiendo variar estos valores dependiendo del lugar de procedencia de la mashua.
- En el ítem 9.3 cuadro 9.3 del apéndice se presenta el contenido de minerales como son calcio 12 mg/100g, fósforo 29mg/100g y potasio 190mg/100g, considerándose como una buena fuente de minerales; no se encontró hierro ni magnesio.
- En el ítem 6.2 cuadro 6.1 se presentan los resultados de la composición proximal de la mashua de color amarillo, observando su alto contenido de agua.
- En el ítem 6.3 cuadro 6.2 se presenta el contenido de ácido ascórbico en la mashua con un valor de 77,5 mg/100g, siendo un valor elevado para un tubérculo.
- En el ítem 6.4 cuadro 6.3 se presenta el contenido de carotenoides totales con un valor de 2,36 mg/100g, el cual justifica su propiedad antioxidante.
- En el ítem 6.5 cuadro 6.4 se presenta el contenido de compuestos bioactivos de la mashua, en lo que se refieren al ácido ascórbico, carotenoides totales, compuestos fenólicos presentando una capacidad antioxidante elevada, con el método de DPPH y ABTS, siendo el segundo ABTS el que cuantifica la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos (ácidos ascórbico y compuestos fenólicos), y compuestos lipofílicos (carotenoides), dado que la capacidad antioxidante total de la mashua es la suma de la capacidad antioxidante en la fase hidrofílica más la fase lipofílica.



VIII REFERENCIALES

1. ALMEIDA, CAROLINA "Recuperación de alimentos ancestrales en la comida moderna, 2010.
2. ARBIZU, C., TAPIA, M.(1992) "Cultivos marginales". Otra perspectiva. Roma FAO.
3. ARIAS, M. M. 2011 "Análisis y comparación de glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*). Tesis para optar título de Magister en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia Bogotá.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST OFFICIAL METHODS OF ANÁLISIS
5. BRACK EGG, Antonio. Diccionario enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo 1999.
6. BLOIS, H. 2005. UV/visible spectroscopy. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H., eds Carotenoids Basel,, BirkhauserVerlag.
7. BUTERA, G. Actividades antioxidantes de frutos. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2007.
8. CADIMA, X. 2006. Tubérculos. Botánica Económica de los Andes centrales.
9. CASTRO, R. y L. SUAREZ 2002. Recuperación de colorantes a partir de desechos agroindustriales de naranja (*citrus sinensis* L.) Variedad Valencia, a nivel piloto – Venezuela

10. CEREZAL, P.T. MARRERO y R.M. PIÑERA. 1994. Fuentes de carotenoides a partir de residuos de naranja. Estudio Preliminar. LA HABANA.
11. CIP, 2013. Centro Internacional de la papa.
12. CLAVIJO, N., TERAN, M., COMBARIZ, J. Tubérculos andinos 2015. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.
13. CRAFT, N.E. 1992. Carotenoid reversed-phase high-performance liquid chromatography methods; reference compendium
14. DAVIES, B.H. 1979. Carotenoids. In: Goodwin, T.W., ed. Chemistry and Biochemistry of Pigments. 2 ed. London, Academic Press.
15. DEUTSCH, MJ. 1990. Vitamins and other nutrients. In: Helrich, K., ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists.
16. DURAN, M. y M.J. MORENO ALVAREZ 2000. Evaluación de algunas mezclas de solvente en la extracción de carotenoides de tamarillo (*Cyphomandra betacea* Sendt). Venezuela.
17. ENCARTA, Biblioteca de consulta 2012.
18. FELLOWS, Peter. Tecnología del Proceso de Alimentos. Editorial Acribia S.A. España 1984.
19. GRAU, A., ORTEGA, R., NIETO, C., HERMANN, M., 2003. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz Ipavon). Roma, Italia. Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales.

20. HART, Leslie; FISHER Harry. Análisis Moderno de los Alimentos.
21. INDECOPI, Norma Técnica para alimentos 1974.
22. KENKEL JOHN. Analisis Instrumental 1999.
23. LUXIMON- RAMMA, A., BAHORUN, T. AND CROZIER, A. 2003.
Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits.
24. MANRIQUE, IVAN. Primer simposio peruano de productos naturales CIP 2017.
25. MANRIQUE, I., ARBIZU, C., VIVANCO, F., GONZALES, R., RAMIREZ, C., CHAVEZ, O., TAY, D. ELLIS, 2014. *Tropaeolum tuberosum*. Catálogo de colección de germoplasma. Lima.
26. MATHEW, H. 2005 . Chemical Analisis and Photoprotective Effect of an extract of wine.
27. MORENO-ALVAREZ, M.J., GÓMEZ, J. MENDOZA y D. BELEN. 1999.
Carotenoides totales en cáscara de naranja (*Citrus sinensis* L. variedad Valencia) Revista Unellez de Ciencia y Tecnología. Venezuela.
28. MURILLO, B: 2007. Methods for testing antioxidant activity.
29. PADILLA, Saúl. Manejo Agroforestal Andino. Proyecto FAO / Holanda.
Desarrollo participativo los Andes 1992.
30. PINEDA, D., SALUCCI, M., LAZARO, R., FERRO-LUZZI, A. 1999.
Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales



constituyentes de algunos alimentos. Revista cubana de Alimentación y nutrición.

31. RE, R., PELLIGRINI, N., YANG, M., AND RICE- EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay.
32. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1993. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous, G., ed. Shelf-Life Studies of Foods and Beverages; Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects, Amsterdam, Elsevier.
33. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. et al. 1988. Assessment of provitamin A determination by open column- visible absorption spectrophotometry.
34. SAFO- KATANGA 1984 Genetic potential and Stability of carotene content in cassava roots.
35. STINTZING, F. C., STINTZING, A. S., CARLO, R., FREI, B., 2002. Color Antioxidant Properties of Cyanidin- based Anthocyanin Pigments. J Agric Food Chem.
36. TAPIA, M. 1990. Los tubérculos andinos. Avances en la investigación sobre tubérculos alimenticios de los andes. Proyecto INIA A CIID ACDI, Bolivia.
37. TRAVIS, C. (1999). Mashua. Recuperado el 19 de abril del 201, de Ethnobotanical Leaflets- Southern Illinois University.
38. VINSON, J., HAO, Y., SU, X., AND ZUBIC, L. 1998. Phenol antioxidant quantity and qualit foods. Journal of agricultural and food chemistry.



IX APÉNDICE

9.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MASHUA

CUADRO 9.1

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MASHUA

Longitud (cm)	Ancho (cm)	Peso promedio /tuberculo (g)
10 ... 14	3 ... 4,5	40

Fuente: Elaboración propia.

9.2 MEDICION DE GRADOS BRUX Y pH DE LA MASHUA

CUADRO 9.2

MEDICION DE GRADOS BRUX Y pH DE LA MASHUA

Nombre común	Nombre científico	Brix	pH
Mashua	Tropaeolum tuberosum	8,5	6,2

Fuente: Elaboración propia.

9.3 CONTENIDO DE MINERALES (mg/100g) EN LA MASHUA

CUADRO 9.3

CONTENIDO DE MINERALES (mg/100g) EN LA MASHUA

Tuberculo	Calcio	Fósforo	Potasio	Fierro	Magnesio
Mashua	12,00	29,00	190,00	0,0	0,0

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 01

MATRIZ DE CONSISTENCIA
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES
<p>Problema General ¿El contenido de los compuestos bioactivos serán características determinantes de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)?</p> <p>Problemas Específicos</p> <p>1. ¿Cuál será la composición química de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)?</p> <p>2. ¿Qué contenido de hierro, magnesio y fósforo tendrá la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)?</p> <p>3. ¿Cuáles serán las propiedades físicas de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)?</p>	<p>Objetivo general Determinar los compuestos bioactivos en la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>).</p>	<p>Hipótesis General Los contenidos de compuestos bioactivos, flavonoides totales (capacidad antioxidante, 180 µg equiv. Trolox/g), compuestos fenólicos (50 – 60 mg ácido clorogénico/100g), ácido ascórbico (120 – 130 mg/100g) y carotenos totales (1,37 mg β caroteno/100g), en la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>), serán determinantes.</p>	<p>Variable dependiente La determinación de compuestos bioactivos en la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>).</p>	<p>Descripción mg / 100g</p>
	<p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analizar la composición química de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>). 	<p>Hipótesis Específicas 1.- Los porcentajes de humedad, proteínas, grasas, fibra y carbohidratos permitirán caracterizar a la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>).</p>	<p>Variable independiente El análisis de la composición química de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)</p>	<p>% Humedad % Cenizas % Fibra bruta % Proteínas % Lípidos % Carbohidratos</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluar el contenido de hierro, magnesio y fósforo en la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>). 	<p>2.- El contenido de hierro, magnesio y fósforo en la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>) tendrán una cantidad óptima.</p>	<p>La evaluación del contenido de hierro, magnesio y fósforo en la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>).</p>	<p>mg Fe/100g mg Mg/100g mg P/100g</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - Analizar las propiedades físicas de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>). 	<p>3.- Las propiedades físicas de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>), como el tamaño, color, pH, °Brix tendrán una calidad óptima.</p>	<p>El análisis de las propiedades físicas de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)</p>	<p>Tamaño Color pH ° Brix</p>