

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**MAESTRÍA DE BROMATOLOGÍA**



**ANTIOXIDANTES EN VARIEDADES Y LÍNEAS NUEVAS  
DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule*) EN BOLIVIA**

**Tesis presentada para obtener el grado académico de  
Magister Scientiarum**

**Autora: Lic. Dora Cruz Callejas**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2013**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
MAESTRÍA DE BROMATOLOGÍA**



**ANTIOXIDANTES EN VARIEDADES Y LÍNEAS NUEVAS  
DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule*) EN BOLIVIA**

**Tesis presentada para obtener el grado académico de  
Magister Scientiarum**

**Autora: Lic. Dora Cruz Callejas**

**Tutor: M Sc. Juan Antonio Alvarado Kirigin**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2013**

## *DEDICATORIA*

*A mi Dios quien me permite ser un instrumento en sus manos y gozar de las experiencias más lindas en la Investigación de su Perfecta Naturaleza.*

*A mis padres: Néstor y Raquel por todas sus enseñanzas, su apoyo y su Gran Amor de Papás, que no se puede enumerar ni explicar, solo aceptar.*

*A mi esposo Wilson porque con su paciencia, comprensión y su Amor fortalecieron mis convicciones.*

## AGRADECIMIENTOS

- *Mi más sincero agradecimiento al Centro de Estudios e Investigaciones Químicas en Alimentos, CEIQA de la Carrera de Química por permitirme ser partícipe del Proyecto “Antioxidantes en Alimentos de Bolivia”*
- *A mi tutor, M Sc. Juan Antonio Alvarado Kirigin un agradecimiento y reconocimiento muy especial por la guía en el trabajo de investigación y culminación de la tesis, por enseñarme a buscar la excelencia en los resultados y por el tiempo invertido en mi formación. Profesor: Dios bendiga su vida, sus proyectos y sueños.*
- *A la Institución PROINPA por la confianza en otorgarme parte del universo muestral de la presente investigación: Ing. Soto e Ing. Pinto.*
- *A todo el equipo de trabajo del CEIQA por el compañerismo y orientaciones que me brindaron durante este tiempo. Sin la compañía y colaboración de parte de todos ustedes, las cosas hubieran sido más difíciles. Gracias amigos y amigas: Milthon, Víctor, Juan Carlos, Pedro, Betty, Maritza, Efraín, Lic. Osvaldo Ramos, Lic. Luis Cáceres y Lic. Carlos Díaz.*
- *A los docentes de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas porque con sus palabras y ejemplo, incentivaron a la conclusión de esta fase de mi formación.*

## RESUMEN

El presente trabajo contribuye a revalorizar la cañihua, grano nativo cuyo potencial es tanto nutricional como funcional por su actividad antioxidante, combinada con las diversas formas de uso alimentario al que puede ser sometido y empleado para todas las etapas de la vida.

Los compuestos polifenólicos de carácter antioxidante, presentes en los alimentos, son responsables de la reducción del riesgo de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Las Especies Reactivas del Oxígeno y el Nitrógeno (EROs y ERNs) intensamente estudiadas en los recientes años por su efecto negativo en la fisiología y patología está conectada al estrés oxidativo. Los antioxidantes polifenólicos y flavonólicos son capaces de neutralizar el exceso de las EROs y ERNs, sugiriéndose un rol importante de éstos en la prevención de la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, neurológicas y el cáncer que son consecuencia de la oxidación de las células.

Los granos andinos como la cañihua son alimentos componentes de la dieta boliviana, en especial del occidente del país, que por su calidad nutricional y presencia de compuestos antioxidantes tienen efectos promisorios en la reducción del riesgo de estas enfermedades crónicas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la Capacidad Antioxidante Total en granos de cañihua, contando con una población muestral de diseño complejo: 2 variedades, 16 accesiones cultivadas por la colección de cañihua del Banco Nacional de Germoplasma de Granos Altoandinos (BNGA) de la Fundación de Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA), 10 muestras silvestres colectadas en el altiplano boliviano y tres muestras comerciales: una de pito de cañihua y 2 granolas a base de cañihua.

Se determinó la Capacidad Antioxidante Total a través de ensayos como: (a) ABTS (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) radical catión); (b) DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y (c) FRAP (Ferric reducing antioxidant power). Además, se midió el Contenido de Fenoles Totales (TPH), Flavonoides Totales (TF), responsables de tal actividad.

Se determinó que la muestra DK1, silvestre de la región altiplánica (Oruro) presentó la Capacidad Antioxidante más alta de todo el universo analizado y que la muestra de harina tostada de cañihua o pito exhibió valores de TAC significativos en relación al grupo de muestras analizado.

Palabras clave: Cañihua; *Chenopodium pallidicaule*; Chenopodiaceae; grano sudamericano

## SUMMARY

The present work seeks to reevaluate this native grain whose potential is so much nutritional, as functional for its antioxidant activity, combined with the diverse forms of alimentary use to which can be subjected and employed for all the stages of the life.

These polyphenolic chemical compounds with antioxidant characteristic, present in the foods are responsible to reduce the risk on illness associated to oxidative stress. Oxygen and nitrogen reactive species (ROS, RNS) were strongly studied recently years ago because its effect on the physiology and pathology is connected to oxidative stress. These antioxidant compounds are able to neutralize the plus on ROS and RNS, suggesting an important function preventing some illness as Atherosclerosis, Cardiovascular diseases, neurologic diseases and cancer that are consequence to cell oxidation.

The Andean grains as canihua are component to Bolivian diet, especially occident of country, because its nutritional quality and antioxidant compounds that have promissory effects reducing risk of these chronic diseases.

The aim of this study was determine total antioxidant capacity in canihua grains and it ended satisfactorily, because the universe of samples on grains of canihua had a complex outline: two variety, sixteen samples corresponding to species from Bank National Germoplasm of Altoandean Grains (BNGA) concerning to Foundation of Promotion and Investigation of Andean Products (PROINPA) and thirteen wild samples collected in the bolivian altiplano, and three commercial samples: "pito" of canihua and two granola based on canihua.

The analysis measured the antioxidant activity by the following methodologies: a) ABTS (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) radical); (b) DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) that check the antioxidant activity by disappear free radical and (c) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay). Besides measure the Total Phenolic Content (TPC) Total Flavonoids (TF), responsible to antioxidant activity, employing corresponding standards.

It was determined that a wild sample DK1, from altiplano of Bolivia that shown the high Antioxidant Capacity of all samples analyzed, besides canihua's flour o pito, exhibit significant TAC values related to the universe analyzed.

Keywords: Canihua; *Chenopodium pallidicaule*; Chenopodiaceae; sudamerican grain.

## LISTA DE ABREVIACIONES

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ABTS+•	Radical catión de ácido 2,2,-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
AH	Antioxidante
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalasa
CUPRAC	Capacidad Antioxidante en cobre reductor
DNA	Acido desoxirribonucleico
DPPH-	Anión 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E.T.	Transferencia de electrones
FRAP	Poder reductor del ión férrico
GPX	Enzima glutatión peroxidasa
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno
L•	Radical lipídico centro del carbono
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LO•	Radical alcoxi
LOO-	Anión peroxilo
LOO•	Radical peroxilo
LOOH	Hidroperóxido
MeOH	Metanol
NO•	Radical libre nitrosilo
O2•	Radical oxígeno
OH•	Radical hidroxilo
RDA	Recommended dietary allowance
ROO•	Peroxiradical
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Enzima superóxido dismutasa
TAC	Capacidad Antioxidante Total
TEAC	Capacidad Antioxidante Total en Equivalente Trolox
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s- triazina
TROLOX	Acido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetralmetilcroman-2-carboxílico
UV/Vis	Ultravioleta/Visible

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Equilibrio entre compuestos oxidantes y efecto antioxidante En el estrés oxidativo .....	3
Figura 2.	Estructura básica de los flavonoides .....	5
Figura 3.	Extensión de la Cultura Chiripa .....	15
Figura 4.	Extensión del Imperio Taypicala (Imperio Tiahuanaco-Wari) ....	18
Figura 5.	Expansión del Imperio Incaico (conocido como Tawantinsuyu)	19
Figura 6.	Área de cultivo de cañihua .....	20
Figura 7.	Granos andinos: A) Cañihua B) Quinua .....	22
Figura 8.	Colores de los granos de cañihua otorgados por PROINPA .....	23
Figura 9.	Cultivo de cañihua en etapa de madurez y post cosecha .....	23
Figura 10.	Cultivo silvestre de cañihua en el Altiplano Boliviano .....	24
Figura 11.	Cultivo de cañihua en el Altiplano Boliviano .....	25
Figura 12.	Cosecha de cañihua .....	25
Figura 13.	Venteo de los granos de cañihua .....	26

Figura 14. Tostado de los granos de cañihua y harina de cañihua .....	30
Figura 15. Producción de especies reactivas y las defensas anti-Oxidantes del organismo .....	40
Figura 16. Reacción de captura de metales por estructuras flavonoides .....	42
Figura 17. Mecanismo de reacción de atrapamiento de radicales .....	42
Figura 18. Fuentes de efectos oxidantes que producen Estrés Oxidativo ..	44
Figura 19. Panorama de las principales vías biosintéticas que producen metabolitos secundarios .....	47
Figura 20. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de las plantas .....	50
Figura 21. Propuesta de mecanismos de transporte de flavonoides .....	52
Figura 22. Estructura química del ABTS•+ .....	62
Figura 23. La concentración de trolox, ABTS• y la quinona formada .....	63
Figura 24. Radical libre y forma no radical de DPPH .....	65
Figura 25. FRAP. Fe (II) (TPTZ) <sub>2</sub> . Cation ferroso tripiridiltriiazina .....	67
Figura 26. Complejo coloreado flavonoide-aluminio .....	69
Figura 27. Producción de cañihua en la Accesión 300 en Comunidad San Pedro y San Pablo. La Paz .....	78

Figura 28. Tubos con extracto metanólico de muestras silvestres .....	80
Figura 29. Curva de Calibración de Estándar Trolox en $\mu\text{M}$ para ensayo ABTS .....	84
Figura 30. Capacidad Antioxidante total de muestras de cañihua por ABTS .....	88
Figura 31. Curva de Calibración de Estándar Trolox en $\mu\text{M}$ para ensayo DPPH .....	89
Figura 32. Capacidad Antioxidante Total de muestras de cañihua por Ensayo DPPH .....	94
Figura 33. Curva de Calibración de Estándar Trolox en $\mu\text{M}$ para ensayo FRAP .....	95
Figura 34. Capacidad Antioxidante Total de muestras de cañihua Por Ensayo FRAP .....	
101	
Figura 35. Curva de calibración de Catequina para determinación De Flavonoides Totales .....	
102	
Figura 36. Concentración de Flavonoides totales en muestras de Cañihua expresado en Equiv. Catequina/g muestra seca .....	
102	
Figura 37. Curva Estándar de Acido gálico mg GAE/ml .....	
106	
Figura 38. Concentración de Fenoles totales expresado en Mg GAE/g de muestra seca .....	
110	
Figura 39. Contenido de Flavonoides totales y Fenoles totales en cañihua .....	
111	
Figura 40. Correlación de ensayo ABTS con DPPH .....	
113	

Figura 41. Correlación de ensayo FRAP con DPPH .....	113
Figura 42. Correlación de ensayo ABTS con FRAP .....	115
Figura 43. Correlación de PTC con ABTS .....	117
Figura 44. Correlación de PTC con DPPH .....	117
Figura 45. Correlación de PTC con FRAP .....	118
Figura 46. Correlación de Flavonoides y ABTS .....	119
Figura 47. Correlación de Flavonoides y ensayo DPPH .....	120
Figura 48. Correlación de Flavonoides y ensayo FRAP .....	120
Figura 49. Correlación de 4 muestras de flavonoides con ABTS .....	121
Figura 50. Correlación PTC vs TAC (DPPH) de 4 muestras de Cañihua .....	122

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de cereales y granos andinos .....	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica de cañihua .....	21
Tabla 3. Tabla de valor nutritivo-agroindustrial de 90 accesiones de cañihua .....	26
Tabla 4. Radicales libres y su fórmula química .....	39
Tabla 5. Relación de muestras y su lugar de origen .....	76
Tabla 6. Presentación de los granos típicos de <i>Chenopodium pallidicaule</i> .....	77
Tabla 7. Relación de Reactivos, estructura, laboratorio y pro- cedencia .....	79
Tabla 8. Relación de Materiales, marca, procedencia empleados .....	79
Tabla 9. Relación de Material de vidrio, plásticos empleados .....	79
Tabla 10. Valores de TAC en $\mu\text{mol TE/g}$ muestra seca en granos de cañihua por ensayo ABTS .....	85
Tabla 11. Valores de TAC en $\mu\text{mol TE/g}$ muestra en muestras Comerciales por ABTS .....	87
Tabla 12. Valores de TAC en $\mu\text{mol TE/g}$ muestra seca de	

	cañihua por DPPH .....	90
Tabla 13.	Valores de TAC en pulpa de frutos aplicando DPPH .....	92
Tabla 14.	Capacidad Antioxidante Total en muestras comerciales .....	93
Tabla 15.	Valores de TAC en $\mu\text{mol TE/g}$ muestra seca de cañihua por FRAP .....	96
Tabla 16.	Relación de mM/100 de Actividad Antioxidante por 100 g de alimento .....	97
Tabla 17.	Valores de TAC mediante FRAP para frutas y vegetales .....	98
Tabla 18.	TAC mediante FRAP de vegetales chilenos .....	99
Tabla 19.	Capacidad Antioxidante en muestras comerciales Obtenidas por ensayo FRAP .....	100
Tabla 20.	Concentración de Flavonoides Totales en muestras de Cañihua expresados en mg de Catequina Equiv/ g de muestra seca .....	103
Tabla 21.	Concentración de Flavonoides Totales en muestras de consumo .....	104
Tabla 22.	Concentración de Fenoles Totales en muestras de cañihua como GAE/g muestra .....	107
Tabla 23	Capacidad antioxidante de nueve plantas promi-	

	sorias peruanas .....	
109		
Tabla 24.	Concentración de Fenoles totales en muestras comerciales .....	
109		
Tabla 25.	Correlación de ensayos: a) R obtenidos* b) Peñarrieta et al** .....	
115		
Tabla 26.	Rango de mínimos y máximos de TAC obtenido por los ensayos .....	
123		
Tabla 27.	Rango de mínimos y máximos de TPC y FT. Valores de Fenoles totales en mg EG/g de muestra seca y los de Flavonoides totales en mg EC/g de muestra seca .....	124

## INDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS	PÁGINA
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	iv
LISTA DE ABREVIACIONES.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
I. INTRODUCCION .....	1
1.1. ANTECEDENTES .....	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
1.3. MARCO TEÓRICO .....	13
1.3.1. Características e historia de la cañihua .....	13
1.3.2. Botánica de la planta .....	21
1.3.3. Composición proximal y nutricional de la cañihua.....	26
1.3.4. Empleo de la cañihua .....	30
1.3.5. Mercado Nacional e Internacional .....	33
1.3.6. La cañihua en el Banco de Germoplasma .....	34
1.3.7. Capacidad Antioxidante .....	35
1.3.8. Compuestos vegetales con efecto antioxidante .....	46
1.3.9. Capacidad antioxidante de los granos de cañihu .....	58
1.3.10. Química de los indicadores fotocolorimétrico .....	60
1.4. JUSTIFICACION .....	70

1.5. PREGUNTA DE INVESTIGACION .....	73
II. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo General .....	74
2.2. Objetivos Específicos .....	74
III. DISEÑO METODOLOGICO	
3.1. Clasificación de la Investigación .....	75
3.2. Materiales .....	75
3.2.1. Muestra .....	75
3.2.2. Reactivos Químicos .....	79
3.2.3. Equipos e Instrumentos .....	79
3.2.4. Insumos y utensilios .....	80
3.3. Obtención de extracto y protocolo de los ensayos .....	80
3.3.1. Obtención del extracto .....	80
3.3.2. Protocolo de las Técnicas Empleadas .....	81
3.4. Expresión de resultados .....	82
IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....	84
4.1. Actividad Antioxidante Total .....	84
4.1.1. Ensayo ABTS de Inhibición .....	84
4.1.2. Ensayo DPPH de Inhibición .....	89
4.1.3. Ensayo FRAP .....	95
4.1.4. Cuantificación de metabolitos Flavonólicos y fenólicos ....	102
4.2. Correlación lineal de los diferentes ensayos realizado .....	112
V. CONCLUSIONES .....	125
VI. RECOMENDACIONES .....	129
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	130
ANEXOS .....	147

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

La búsqueda de nuevas fuentes de alimentos y/o la recuperación del uso de alimentos relegados como el de varios cultivos andinos que pudieran servir para solucionar en parte el déficit proteico-calórico observado tanto a nivel latinoamericano como mundial cobra cada vez mayor importancia. Ya a partir del año 1960 el Club de Roma estableció los límites del crecimiento y la no sostenibilidad de los modelos de crecimiento ilimitado. Precisamente en esos años se inició el estudio de muchos alimentos entre ellos los granos andinos: la quinua *Chenopodium quinoa* Wild y la cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen, productos altamente nutritivos que se han cultivado en forma tradicional en el área andina desde la época incásica. Usados en la alimentación de los pueblos antiguos de Sudamérica como alimentos básicos. Sin embargo, el cultivo de éstos en el altiplano disminuyó después de la conquista española, cediendo el paso a otros granos introducidos como el trigo y la cebada, aunque el cultivo de estas especies andinas no desapareció.<sup>1</sup>

El presente trabajo busca validar y promover el consumo de los granos andinos no sólo a nivel local y nacional sino inclusive internacional. En la Bolivia actual se ha detectado que la lógica de producción mercantil se conjuga con la lógica de producción de RTAs (Raíces y Tubérculos Andinos) y granos andinos para el autoabastecimiento familiar. Esta conjugación permitió la supervivencia de una serie de cultivos relegados y postergados, aunque no se ha frenado el retroceso general y la pérdida de la biodiversidad de varios cultivos andinos. Han sido estudiados los circuitos locales de mercado no tradicional, llegando a la conclusión de que en las comunidades estudiadas se conjugan los objetivos de reproducción social-comunitaria, que son diferentes, con los objetivos de acumulación mercantil. El destino que las familias confieren a su producción, presenta características múltiples-combinadas: autoconsumo para la

alimentación familiar y del ganado; venta para obtención de dinero que se invertirá en la compra de productos complementarios no producidos en la zona; semilla para la reproducción del sistema y de la biodiversidad; trueque (cambio) por productos de otros sistemas ecológicos, en ferias y agradecimiento por la colaboración de mano de obra extra familiar (ayni, mink'a, etc.).<sup>2</sup>

El trueque y el ayni, reflejan un importante dinamismo de variedades en la zona; 83% de las familias obtienen sus semillas sin la intervención del dinero, sólo el 17% la obtiene mediante la compra.<sup>3</sup>

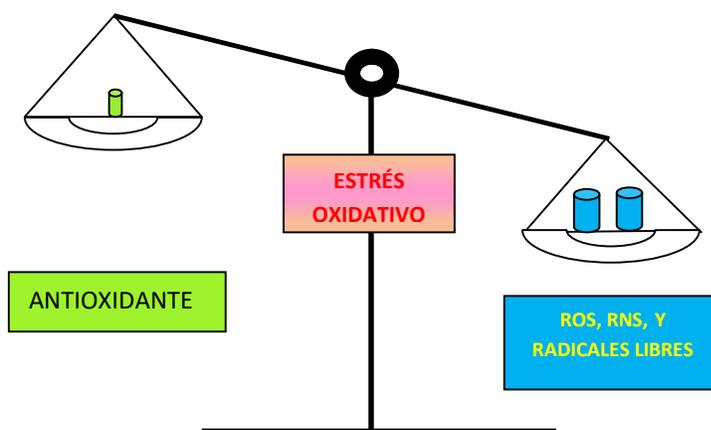
Sobre todo en los últimos cinco años ha obtenido gran impulso la producción de quinua destinada a la producción exportable gracias a la construcción de circuitos mercantiles. Han proliferado microempresas dedicadas al procesamiento de la quinua en diferentes productos: quinua lavada, harina, hojuelas y fabricación de alimentos extruidos. Sin embargo, en el caso de la cañihua todavía no se ha detenido el retroceso en su producción y el trabajo de mejoramiento genético es aún muy insuficiente.

Resulta sorprendente el contraste entre un porcentaje de población mundial que se encuentra sometido a problemas de desnutrición y otro que presenta efectos contrarios, debido a excesos en la alimentación, uso de comida chatarra, estrés y otros factores que han incrementado el número de enfermos derivados por una inadecuada alimentación y otros factores. El origen de enfermedades de naturaleza multifactorial como la aterosclerosis, hipertensión, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, cáncer y otras afecciones inflamatorias, se han dado por un desbalance entre el equilibrio de sustancias oxidantes y antioxidantes.<sup>4, 5</sup>

Por ello, se ha reforzado el interés tanto en la química de los alimentos, el adecuado proceso de los alimentos a nivel tanto industrial como casero, la

nutrición biomédica, así como el consumo de alimentos dotados de ciertos metabolitos secundarios con funciones diversas, entre ellos los antioxidantes naturales de ciertas plantas cuya función, por ser naturales y estar presentes en la matriz alimentaria, se prefiere frente a antioxidantes sintéticos que actualmente se emplean en la industria alimentaria para elevar el tiempo de vida de algunos alimentos, estabilizando lípidos, vitaminas y productos que otorgan sabor a los alimentos.

La meta es ahora “tener el arco iris en la mesa” y gozar de una dieta rica en productos frescos, variada y equilibrada que podría proporcionarnos una cantidad aceptable de antioxidantes capaces de neutralizar a los radicales libres. (Ver fig. 1.1) Sin embargo, existen factores de riesgo adicionales en el modo de vida actual que provoca exceso de radicales libres (debido al humo, la contaminación, el sol, los agentes químicos) y en la mayoría de los casos la dieta no es la adecuada. Para mejorarla, debería incluirse diariamente una buena proporción de frutas, verduras y legumbres, acompañadas de cereales integrales y nueces.<sup>5</sup>



**Figura 1.** Equilibrio entre compuestos oxidantes y efecto antioxidante en el estrés oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

La neutralización de los radicales libres se logra potenciando el efecto de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, GPx y la superóxidodismutasa, SOD, de minerales como el selenio y el zinc, asegurando

la presencia en la dieta de vitamina C, de vitamina E y suministrando en la matriz alimentaria compuestos flavonoides de efecto antioxidante.

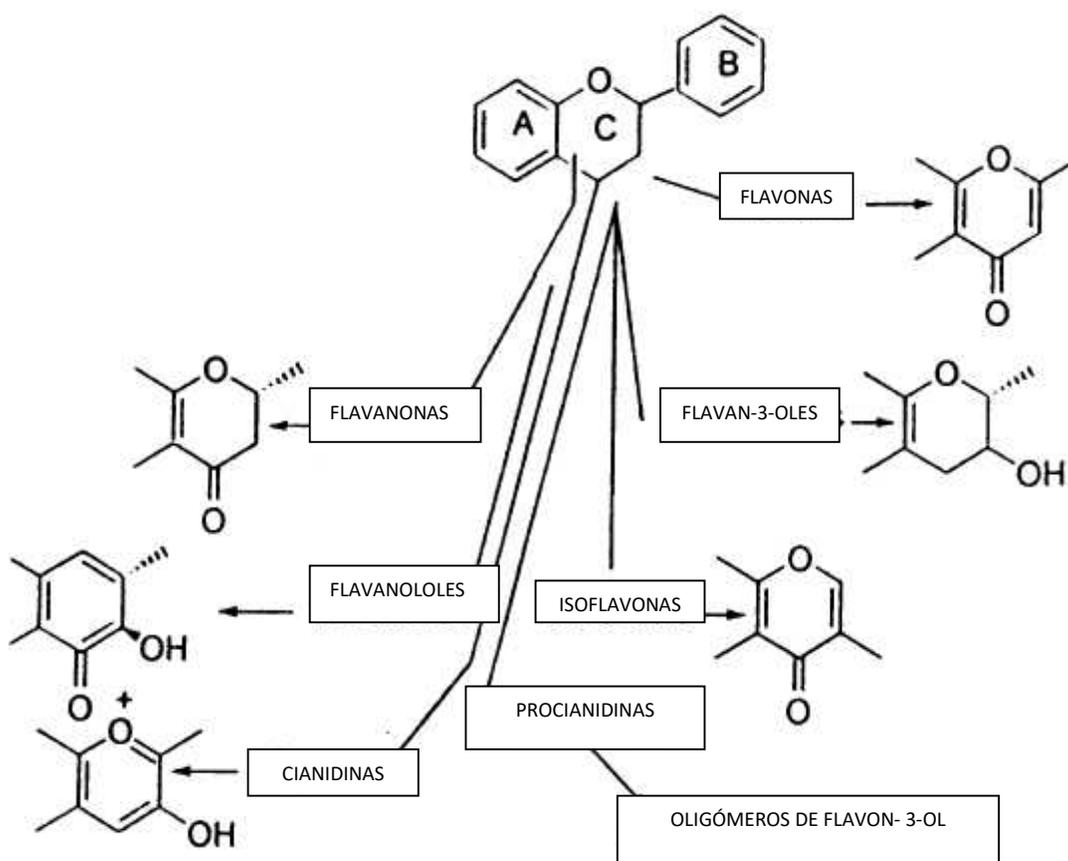
Un gran papel en los efectos antioxidantes juega la presencia de flavonoides y de otros compuestos fenólicos. Los flavonoides están ampliamente distribuidos en los vegetales y frutas.<sup>6</sup>

Estos compuestos químicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Los tres grupos más importantes son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles, siendo el primero uno de los más estudiados. Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo.<sup>7</sup>

Los fenoles poseen efectos antioxidantes y como tales atrapan radicales libres, previniendo que éstos se unan y dañen las moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), un paso crítico en la iniciación de los procesos carcinogénicos. Hay antioxidantes naturales (fisiológicos), presentes en nuestro organismo y los sintéticos. Dentro de cada grupo, los antioxidantes pueden ser enzimas que aumentan la velocidad de ruptura de los radicales libres, o previenen la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres y los inactivadores o atrapadores "*scavengers*", protegiendo de esa manera de las infecciones, del deterioro celular, del envejecimiento prematuro y probablemente, del cáncer. Los compuestos antioxidantes son también un grupo de vitaminas, minerales y enzimas que protegen nuestro cuerpo de la formación de estos radicales.<sup>8,9</sup>

Los flavonoides pueden poseer tanto actividad antioxidante como pro oxidante, la cual va en función a su diferente estructura química, de los cuales la quercetina (flavona), taxifolina (flavanona) y catequinas (flavanol) poseen diferentes estructuras básicas, pero con el mismo patrón de hidroxilación. Sin

embargo la diferencia es la presencia de un grupo orto-catecol en el anillo B que es determinante de una actividad antioxidante alta. Aunque una excepción observada es el kaempferol, flavanona que a pesar de no contener dicho grupo, presenta alta actividad antioxidante atribuida a un doble enlace 2,3 y el grupo hidroxilo en posición 3 de la estructura básica de los flavonoides. (Fig. 2)



**Figura 2.** Estructura básica de los flavonoides. Fuente: tomado de Tiwari A. (2001).

Según Repo-Carrasco (2008), se encontró que de todos los granos andinos, el de mayor contenido en sustancia antioxidante encontrado fue en muestras de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), quinua (*Chenopodium quinoa* ecotipo marrón) y finalmente la kiwicha (*Amaranthus caudatus* eco. negra).<sup>10, 11</sup>

En los estudios de Rastrelli (1995), se dilucidaron dos estructuras nuevas de flavonoides en cañihua: isoramnetina 3-O-β-D-apiofuranosil-(1 2)-O-[ -L-ramnopiranosil (1 6)]- β -D-glucopiranosido y quercetina 3-O- β -D-apiofuranosil (1 2)-O- α-L-ramnopiranosil (1 6)-β-D-galactopiranosido.<sup>12</sup>

Entre otros constituyentes encontrados en éste grano, por el mismo investigador, se determinó la presencia de tres saponinas y siete compuestos triterpenoides. (1996)<sup>13</sup>

La presencia de ecdisoma hidroxilada es un marcador quimiotaxonómico muy propio de las quenopodiáceas y es un dato importante para la identificación de otras especies. La ecdisoma hidroxilada constituye un grupo químico esteroideo. El primer reporte de fitoecdisteroides de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) que se cree juega un papel importante en la protección de la planta, fue presentado en los estudios de Rastrelli et al (1996).<sup>14</sup>

En un estudio preliminar Peñarrieta et al (2005) se realizó un barrido de la actividad antioxidante de ocho alimentos propios de la región altiplánica de Bolivia: tarwi, quinua, amaranto, ulluco, papa, arracacha, oca y cañihua. Siendo este último cultivo el que exhibió valores más altos de TAC (Actividad Antioxidante Total) por los ensayos de ABTS y FRAP.<sup>15</sup>

Posteriormente, Peñarrieta et al (2008)<sup>16</sup>, trabajaron con varias muestras de plantas de cañihua obtenidas por muestreo puntual aleatorio en el altiplano boliviano determinando valores de actividad antioxidante y obteniendo valores bastante elevados, posiblemente debidos a la técnica de extracción, mediante los ensayos ABTS y FRAP (Ión férrico reductor del poder antioxidante). El principal mérito de este trabajo está en la identificación cualitativa de los compuestos fenólicos presentes en la cañihua, por análisis de HPLC que mostró presencia de ocho componentes mayoritarios identificados como

catequin-galato, catequina, ácido vainílico, kaemferol, ácido ferúlico, quercetina, resorcinol y 4-metil-resorcinol, compuestos fenólicos responsables del valor de TAC determinado por el ensayo ABTS, especialmente la presencia de resorcinol y catequina. Las interacciones que existen entre todos los compuestos favorecerían la actividad antioxidante de ésta planta promisorio. Asimismo la presencia de ácido vainílico explica el buen sabor de los productos obtenidos con la cañihua.

La cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) tiene como centro de origen la región de los Andes de Bolivia y del sur del Perú, distribuyéndose en las regiones semiáridas más altas; soporta climas rigurosos con heladas, sequías y bajas temperaturas (-3° C), sin afectarse su producción.

Los granos de cañihua han sido identificados como un alimento altamente promisorio por su valor nutritivo, alto contenido lipídico, patrón de aminoácidos ideal, con alto contenido de lisina. Esta planta no sólo ha sido empleada como fuente alimentaria, se le han atribuido cualidades terapéuticas por la medicina indígena en el efecto de reducción del colesterol, en el tratamiento contra la fiebre tifoidea, disentería, blenorragia y afecciones urinarias.<sup>17</sup>

El grano de cañihua presenta un elevado contenido de proteínas (15-19 por ciento) y al igual que la quinua y kiwicha, tiene una proporción importante de aminoácidos azufrados; posee un buen balance de aminoácidos, siendo particularmente rica en *lisina, isoleucina y triptófano*. Esta calidad proteica, en combinación con un contenido de glúcidos del orden del 60% y el añadido de dos aceites vegetales del orden del 8%, la hacen altamente nutritiva.

La tabla 1, muestra una comparación de la composición proximal de cereales y granos andinos, porcentaje de proteína, grasa, fibra cruda, ceniza y glúcidos. Los diferentes cereales presentan un patrón singular de los

parámetros citados. Se encuentra referido a gramos del nutriente en relación a 100 g de alimento.

**Tabla 1.** Composición proximal de cereales y granos andinos (g/100 g Materia seca)

ALIMENTO	PROTEÍNA	GRASA	FIBRA CRUDA	CENIZA	GLÚCIDOS
Trigo Manitoba	16.0	2.9	2.6	1.8	74.1
Trigo Inglés	10.5	2.6	2.5	1.8	78.6
Cebada	11.8	1.8	5.3	3.1	78.1
Avena	11.6	5.2	10.4	2.9	69.8
Centeno	13.4	1.8	2.6	2.1	80.1
Triticale	15.0	1.7	2.6	2.0	78.7
Arroz	9.1	2.2	10.2	7.2	71.2
Maíz	11.1	4.9	2.1	1.7	80.2
Sorgo	12.4	3.6	2.7	1.7	79.7
Quinua	14.4	6.0	4.0	2.9	72.6
<b>Kañiwa</b>	<b>18.8</b>	<b>7.6</b>	<b>6.1</b>	<b>4.1</b>	<b>63.4</b>
Amaranto	14.5	6.4	5.0	2.6	71.5

Fuente: Repo-Carrasco (1992)

La cantidad de proteína de la cañihua es mayor inclusive a la del trigo Manitoba. Tanto la quinua como la cañihua, son relativamente ricas en lípidos. El aceite de estos granos tiene alto contenido en 3 ácidos grasos insaturados, así como también en tocoferoles.<sup>18,19, 20</sup>

Actualmente la cañihua se cultiva para la producción de grano que es empleado en la alimentación humana y aves de corral. El rendimiento usual de grano de cañihua es de cerca de 1000 kg/ha, aunque en buenas condiciones de suelo el rendimiento puede duplicarse o triplicarse, según el estudio de Cahuana (1975), la variedad Lasta cañihua anaranjada destacó por su rendimiento de 25.000 kilos de planta verde por hectárea, cuando realizó un estudio comparativo de rendimiento de cinco formas botánicas de cañihua tomando tres distanciamientos entre surcos.<sup>21</sup>

La forma de consumo humano de la cañihua es principalmente como pito de cañihua o kañiwako, que es grano tostado y molido evitando su quemado. El

producto es aromático pues entre sus flavonoides está el ácido vainílico (Peñarrieta et al) <sup>16</sup> pudiendo combinarse con azúcar, leche, agua. Con los granos enteros, reventados pueden prepararse turrone, dulces y otros productos de confitería derivados del grano de cañihua como: expandidos de cañihua, barras energéticas, hojuela, harina, pastas y fideos, etc. <sup>20</sup>

En estudios realizados en 1993, se formularon mezclas alimenticias de quinua-cañihua-haba, proporcionando un alto valor nutricional que se acercaba al de la caseína (mezcla: 2,36; caseína: 2,5)<sup>22</sup>, justamente considerando la calidad nutricia de estos granos, entre ellos la cañihua.

Acerca de su uso en animales, se observó que una alimentación con un 40% de harina de cañihua, junto a otras harinas (trigo, maíz) para cuyes dio un resultado positivo, que elevó la ganancia de peso de éstos animales, atribuyéndose este incremento al buen sabor de la cañihua en relación a otras dietas comerciales, determinándose una mejor retribución económica.<sup>23</sup>

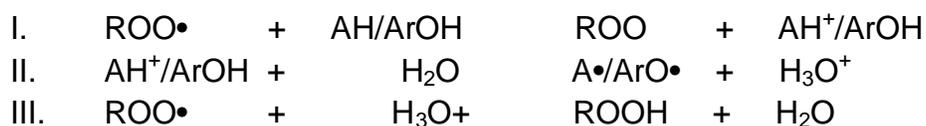
La capacidad antioxidante total es una estimación fiable y global de la capacidad antioxidante de un alimento, parámetro que permite valorar la calidad dietética de un producto analizado, como ya se mencionó éste proviene de las frutas y vegetales, en su contenido de vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno y polifenoles de plantas (flavonoles, flavanoles, antocianinas y fenilpropanoles) <sup>24</sup>

No hay un parámetro singular para evaluar el estatus o capacidad antioxidante de alimentos y fluidos biológicos, como por ejemplo tiene la dureza del agua ampliamente aceptado en Francia, definido como la cantidad de mg de dureza equivalente de  $\text{CaCO}_3$  por 100 mL de agua. Toda la comunidad científica entiende lo mismo si expresa un nivel dado de dureza del agua, pero desafortunadamente, no es posible una abstracción análoga de conocimiento útil a partir de los resultados de las pruebas de actividad/capacidad antioxidante

que posee diferentes mecanismos, los que se basan en diferentes procedimientos y diferentes unidades reportadas. Las consecuencias inevitables de la situación corriente son que los valores antioxidantes de los alimentos no pueden ser evaluados y comparados efectivamente, no puede ser preparado un inventario objetivo de los alimentos vegetales antioxidantes, no se pueden diseñar dietas ricas en antioxidantes de aceptación amplia, y el estatus antioxidante total del suero humano (por ejemplo) no puede servir como un indicador activo para detectar y monitorear las enfermedades.

En la actualidad existen muchos métodos disponibles para la determinación de la capacidad antioxidante, sin embargo existe una gran necesidad de estandarizar estos métodos porque la falta frecuente de un sustrato específico en el procedimiento, la composición del sistema y los métodos de oxidación inducida podría limitar esta exactitud. De hecho, la actividad antioxidante es un sistema complejo que no puede ser evaluado satisfactoriamente usando una sola prueba, por ello se requieren varios procedimientos que medirán las diferentes reacciones que se suceden en la acción antioxidante de los diferentes compuestos fenólicos, flavonólicos, etc. Las pruebas diseñadas para la determinación de la capacidad antioxidante, requieren equipo y reactivos especiales. Entre ellos el ensayo ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), el ensayo DPPH (2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil) y el ensayo FRAP (ferric reducing antioxidant power) <sup>25,26</sup>

Muchos ensayos de capacidad antioxidante pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción, como de transferencia de electrones (ET, *Electron Transfer*). Los mecanismos de acción antioxidante, de forma general, se basan en las siguientes reacciones:



Estas reacciones son relativamente más lentas y dependientes del disolvente y del pH. De hecho, en la mayoría de los ensayos basados en la ET, la acción antioxidante se simula con un muestra de prueba de potencial redox, es decir, los antioxidantes reaccionan con una muestra de prueba coloreada (agente oxidante) <sup>27,28</sup>

Los ensayos espectrofotométricos se basan en medir la capacidad de un antioxidante al reducir tal oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color (aumento o disminución de absorbancia a una determinada longitud de onda) está correlacionado con la concentración de antioxidantes en la muestra. <sup>29, 30, 31,32</sup>

Los métodos a emplearse en el presente trabajo permitirán por diferentes perspectivas y mecanismos de reacción observar y medir el efecto antioxidante, midiendo tal capacidad con el empleo de sustancias estándar bajo las mismas condiciones que los extractos de las 31 muestras con las que se cuenta. Se definirá cuál de las muestras posee un valor más alto en contenido de Flavonoides totales, Fenoles totales y Actividad Antioxidante Total de la cual son responsables los compuestos mencionados.

## 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de granos andinos como cañihua, quinua y otros, habiendo sido relegado en el mercado por muchos años, actualmente ha mostrado un gran impulso en su estudio y uso debido a que los consumidores buscan ahora alimentos nutricionalmente benéficos y también con caracteres preventivos para las diferentes patologías que actualmente aquejan a las poblaciones, como las cardiovasculares, cáncer, enfermedades por estrés cuyo número ha crecido en niveles sin precedentes, sin embargo se ha visto reducir éste número por el consumo de alimentos vegetales que contienen cantidades significativas de compuestos con efecto antioxidante, evitando así la oxidación y permitiendo un balance entre los efectos oxidantes y los antioxidantes representados por compuestos exógenos asociados a la dieta como son los fenólicos, vitaminas, oligoelementos, etc.

Trabajos previos muestran a la cañihua como un grano valioso en su función antioxidante. Por lo tanto determinar la presencia de antioxidantes fenólicos y grupos flavonoides en variedades y líneas nuevas de cañihua como alternativa alimentaria a la insuficiente, inadecuada, mala alimentación por parte de las diferentes poblaciones valorizará el consumo de los granos de cañihua. Granos que se encuentran catalogados dentro del Banco Nacional de Germoplasma con cierta información de su origen tendrán un valor más amplio por los análisis realizados. Además, la diversidad de colores de los diferentes granos mostrará posiblemente alguna relación con su contenido de sustancias antioxidantes. Todas las determinaciones a realizar confirmaran trabajos previos relacionados a éste grano incrementando el número de especies promisorias.

### 1.3. MARCO TEÓRICO

#### 1.3.1. Características e Historia de la cañihua

Los Andes centrales fueron uno de los principales centros de domesticación de plantas alimentarias en el continente americano. Aproximadamente 10.000 años a.n.e., el nivel del lago Titicaca era aproximadamente 5 metros más elevado que ahora. Durante este período, había más al sur un inmenso lago (43 000 km<sup>2</sup>), con una profundidad de varias decenas de metros, que abarcaba los lagos Uru-Uru, Poopó, Coipasa y Uyuni e incluía la actual región de los "salares": el lago Tauca. Durante todo el período que precede la cultura lítica Viscachani, la primera conocida, gran parte del Altiplano actual se hallaba cubierta por las aguas. Según estudios de Bouysse-Cassagne (1991)<sup>33</sup>

La cañihua, qañiwa, es un grano cuyo centro de origen está en la región de los Andes centrales cuyo cultivo data de épocas muy antiguas y es contemporáneo al establecimiento de la matriz alimentaria circumlacustre elucidada y estudiada por D.L. Browman<sup>34</sup> (1983). La cañihua es un grano semidomesticado cuyas muestras arqueológicas son insuficientes por problemas de conservación. La cañihua (del quechua: *qañiwa*), *Chenopodium pallidicaule*, es una quenopodiácea similar en su composición a la quinua, una planta relacionada. Es una herbácea, anual de 2 a 9 dm de altura, muy ramificada. Presenta tallos, hojas e inflorescencias cubiertas de vesículas blancas a rosáceas. Tiene importantes características beneficiarias las cuales incluyen una tolerancia a las condiciones de altas alturas montañosas, el alto contenido proteico de sus granos, así como su importante actividad antioxidante y por su contenido de compuestos fenólicos, sumado a la poca presencia de saponinas, las cuales causan dificultades y complicaciones para el uso de la

quinua. La domesticación de la cañihua aún no es amplia por la falta de uniformidad de la madurez de sus granos, algo que limita la producción.

Los quenopodios, quinua y cañihua son fuentes de proteínas extremadamente importantes. Su utilización exitosa debió de haber ocurrido antes de que las primeras poblaciones de pastores nómadas hayan podido pasar al empleo de métodos de cultivo que dependieran de la agricultura y que les permitieran utilizar sus animales como fuente de capital en actividades de comercio, más bien que como fuente de carne primordialmente. La proporción de proteína que proveen estas plantas es distinta entre las diversas variedades y, dentro de la misma variedad, depende de las condiciones de crecimiento. Frecuentemente, se señala una fluctuación de entre un 15 a un 25 por ciento en el caso de las quenopodiáceas, colocando así a la quinua y a la cañihua en un nivel superior a aquellos granos occidentales estándar, como el arroz, el trigo, etc. (Eiselen, 1956; Tapia Vargas, 1976; White et al, 1955 cit. por Browman).<sup>34</sup> Las quenopodiáceas también contienen cantidades significativas (en términos de las cantidades diarias recomendadas) de calcio, fósforo, hierro, tiamina, riboflavina, niacina, y cantidades menores de ácido ascórbico, potasio, magnesio, manganeso y zinc.<sup>34</sup>

La utilización temprana, de los quenopodios, se vio disminuida por las saponinas asociadas; que incluso hoy día limita su consumo, por la necesidad de eliminar la saponina glucosidada del grano. Las saponinas son alcaloides que se encuentran principalmente en las cápsulas del episperma de la planta, que dan el sabor amargo al grano y vuelven jabonosa el agua con que se lava la semilla. Aunque no son letales en términos de la proporción presente, se encuentran concentraciones significativas, que por lo general fluctúan, entre un 0,25 y un 0,50 por ciento. La eliminación de la saponina se logra por repetidos lavados del

grano con el propósito de liberar la mayor cantidad de sustancias posibles. Estos métodos primitivos no son ciento por ciento efectivos, pero sí eliminan la mayor parte de la saponina. Sin embargo, como es de suponer, los lavados repetidos no sólo eliminan la saponina, sino que también reducen el valor nutritivo del grano al eliminar alrededor de la mitad de la proteína contenida, de altas proporciones de 20 - 25 por ciento registradas para algunos quenopodios.<sup>34</sup>

### Cultura Chiripa

La cultura Chiripa fue una de las más antiguas de la región andina, cuyos restos aparecen desde la península de Taraco por el sur, hasta Santiago de Huata por el norte, incluso en la Península de Copacabana, en las riberas del Lago Titicaca (cuyo antiguo nombre era Pukinacota), Bolivia.



**Figura 3.** Extensión de la Cultura Chiripa.  
Fuente: Wikipedia

Los vestigios de estas primeras culturas lacustres se manifiestan a través de ciertas prácticas agrícolas, principalmente la construcción de camellones (sukakollus, waru-warus, ridged fields).

Una primera fase de construcción y utilización intensa de camellones habría tenido lugar entre 1500 y 500 a.n.e. La instalación y utilización de estas técnicas agrícolas estaba directamente ligada a una mejor gestión del agua en medios pantanosos. Esta primera fase de utilización coincide con las 2 primeras fases y el inicio de la tercera fase de la cultura Chiripa.

Según los últimos estudios que se han realizado en la península de Taraco y considerando los datos de los sitios Chiripa, D.L. Browman (1983) y otros han delimitado las siguientes tres fases<sup>35</sup>

- a) *Chiripa temprano* (1500–1300 a.n.e. a 1000-850 a.n.e.).
- b) *Chiripa medio* (1000—850 a 800—600 a.n.e.). En esta fase la cultura Chiripa fue la primera en dominar los sistemas y técnicas de la agricultura de camellones. Su alimentación fue a base de olluco, oca, mashua (isaño), papa, quinua y cañihua. La etapa de más numerosa construcción de camellones se habría desarrollado entre 800 y 600 años a.n.e.
- c) *Chiripa tardía o Clásico* (800—600 a.n.e. a 200—100 a.n.e.).

La cultura Chiripa gracias a la construcción de camellones inició el cultivo masivo de la papa, la producción de chuño, el cultivo de otros tubérculos como la oca, el isaño, el olluco y promovió el cultivo de los granos andinos: quinua y cañihua. La agricultura fue complementada por la pesca.<sup>36</sup>

## **Cultura Pucara**

La cultura Pucara fue —como después sería Taypicala— una cultura filial o hija de la Cultura Chiripa. Su periodo de florecimiento abarca del Siglo II a.n.e. al siglo VI d.n.e. Los pucara fueron una cultura cuyo lenguaje era muy presumiblemente el pukina, que habitaron el extremo noroccidental de la meseta del altiplano, en el actual departamento peruano de Puno a 3800

msnm. Su establecimiento se dio a partir del siglo II a.n.e., y su disolución se da aproximadamente en el siglo VI d.n.e. Con la fluctuación de los niveles del lago, al inundarse Wiñaymarca, fueron retrocediendo los camellones chiripas. Se produjo un largo período de abandono, o utilización reducida, que habría comenzado hacia el año 300 a.n.e., y habría proseguido hasta 500 años d.n.e. (Bouysse-Cassagne, 1991)<sup>33</sup>. La mayor densidad de camellones se da en los sitios Chiripa, en la península de Taraco, en los sitios en que emergería la cultura Pucara y en la región de Puno.

La población pukina se trasladó a la ribera norte del lago y desarrolló la cultura Pucara siguiendo los patrones de la matriz alimentaria circumlacustre y complementando el modo “altiplano” con el manejo naciente de pisos ecológicos que fueron paulatinamente estableciendo los pukinas en sus regiones: Urco-suyu (aledaña a la puna), Uma-Suyu (aledaña a la ribera circumlacustre) y Cole-suyu (aledaña a la Costa del Pacífico en la región inscrita entre Arequipa-Iquique-Loa).

La cultura Pucara aplicó los conocimientos de la cultura Chiripa referidos a olluco, oca, mashua, papa y quenopodiáceas (quinua y cañihua) que producían en las regiones suni y puna, además del maíz, éste último en menor proporción. La base de su economía, fue la ganadería de altura de auquénidos: vicuña, llama, alpaca y guanaco.

### **La Civilización de Taypicala**

Taypicala emergió sobre la base de las culturas circumlacustres previas en el valle del río actualmente denominado Tiahuanaco (Bolivia), y alcanzó altos grados de tecnología lítica y agrícola. La civilización pukina de Taypicala (más conocida como Imperio Tiahuanaco-Huari) desarrolló la revolución agrícola iniciada por la precedente cultura Chiripa. Su economía se basaba en el cultivo de papa, que para su almacenaje era deshidratada en la forma que

hoy se conoce como "chuño"; así mismo —además de la pesca— se cultivaban tubérculos como la oca, el isaño y el olluco. También se cultivaba la quinua y la cañihua.

El desarrollo de Taypicala se divide en 3 periodos o 5 épocas, que son:

- Aldeano: Épocas I y II (1500 a.n.e. - 45 d.n.e.)
- Urbano: Épocas III y IV (45 d.n.e. - 700 d.n.e.)
- Expansivo: Época V (700 d.n.e. - 1200 d.n.e.)

Los pukinas de Taypicala mostraron un desarrollo sociopolítico sin precedentes, superando las dificultades que representaba su entorno ecológico (el altiplano sobre los 3800 msnm). Según estudios hechos por Alan Kolata (1977) los taypicalas desarrollaron una agricultura con excedentes que permitieron la revolución urbana y la subsistencia de la élite.<sup>37</sup>

Al producirse la revolución urbana, Taypicala dejó de ser la aldea concentrada de los primeros tiempos para convertirse en una gran urbe ceremonial que tiene dos centros dominantes: el conjunto de Akapana con los edificios que la rodean y el Puma-Punku situado al suroeste de Akapana. Ambos muestran la estructura doble de Taypicala, que evidencian la visión de dualidad propia de la sociedad andina, se divide en dos; Anan (los de arriba) y Urin (los de abajo). Todas las ciudades andinas, incluyendo Cusco siguieron posteriormente este patrón urbano.



**Figura 4.** Extensión del Imperio Taypicala (conocido como Imperio Tiahuanaco-Wari). Fuente:Wikipedia

Fue en las épocas III y IV que Taypicala muestra en su período urbano una gran actividad de construcción de camellones y un importante incremento del producto de la pesca mediante el uso de redes de totora que llevaron a la reducción del número de especies endémicas de Orestias (karachis).

### Civilización e imperio incaico

El estado inca basaba su existencia y economía en la agricultura, desarrollando un gran potencial en cuanto al empleo y cultivo de diversos alimentos como: raíces, granos, legumbres, vegetales, frutas y nueces, productos que se desarrollaban en un complejo territorio cuyos climas iban desde el trópico hasta la puna. Este imperio tenía una jurisdicción que llegó a extenderse desde el sur de Colombia hasta la parte central de Chile.

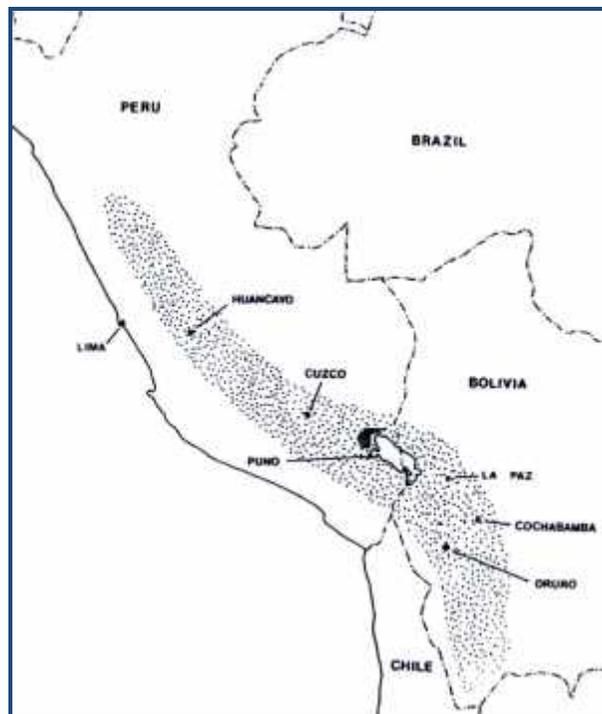
Se estima que en la extensión del imperio incaico se cultivaron cerca de setenta especies vegetales, entre ellas, tubérculos (papas, camotes, isaño, olluco, yacón), maíz, ajíes, algodón, tomate, maní, quinua, cañihua y coca. Se resalta su técnica de mejoramiento de especies porque conocían la mayor influencia de la temperatura del suelo que la del aire sobre las plantas, como lo atestigua el “laboratorio” de los amautas en Moray. Sus principales técnicas agrícolas, en cuanto a la disposición de tierras fueron:



**Figura 5.** Expansión del Imperio Incaico (conocido como Tawantinsuyu). Fuente: Wikipedia.

- Andenes o terrazas, para evitar la erosión y aprovechar laderas y cerros.
- Waru waru (sukakollus), técnica heredada de Chiripa, Pucara y Taypicala, en la que se araban surcos alrededor de los cultivos y se les llenaba de agua para crear un microclima más estable que el ambiente.
- Pozas secas que se llenaban en época de lluvias. Era muy empleado en la costa. Se les llamaba simplemente lagunas o *cochas*.

La invasión española introdujo muchos alimentos entre ellos algunos tan beneficiosos como el trigo, la cebada, la avena, la arveja, el haba, etc. que reemplazaron a varios de los cultivos autóctonos por su mayor facilidad de cultivo o proceso o por su mayor prestigio. Muchas raíces, granos, legumbres y frutas fueron hasta cierto grado postergados u olvidados. Entre los granos contamos a la quinua (*Chenopodium quinoa*), cañahua o cañihua (kañiwa) (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (quiwicha, coimi o millmi) (*Amaranthus caudatus*).<sup>38</sup>



**Figura 6.** Área de cultivo de cañihua. Fuente: Extraído de Lost Crops of the Incas<sup>39</sup>

### 1.3.2. Botánica de la planta

Tabla 2. Clasificación taxonómica de cañihua

NOMBRE BOTÁNICO:	<i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen
FAMILIA:	Chenopodiáceae
NOMBRES COMUNES:	
▪ BOLIVIA	cañahua, qañawa, iswalla, kañawi, kañawa, kañahua
▪ QUECHUA	kañihua, kañahua, kañagua, guitacañigua, ayara, cuchiquinoa
▪ AYMARA	iswalla, hupa, ahara, hupa-aara, ajara, cañahua, kañahua
▪ ESPAÑOL	cañihua, cañigua, cañahua, cañagua
▪ INGLÉS	kañihua, canihua

Fuente: Elaboración propia

Es una planta que crece entre 3200 a 4300 m.s.n.m. Requiere suelo franco arenoso a franco arcilloso con suficiente fósforo y con buen drenaje. El pH favorable es de 4.8 a 8.5, tolerando salinidad. Su ciclo de cultivo es de 110 a 180 días.

La siembra es en forma directa en surcos o al voleo, en época de lluvias (septiembre y octubre) dependiendo de la disponibilidad de humedad del suelo. Para el control de crecimiento es necesario el abonamiento, control de malezas, sanidad contra algún tipo de plaga.<sup>40</sup>

Es una planta anual de 25 a 70 cm, con variaciones en la ramificación, ésta se basa en su forma de crecimiento de la planta, color del grano y del follaje. Los tipos:

- Saihua kañiwa: crecimiento recto, grano castaño
- Saihua ccoito: crecimiento recto, grano negro
- Lasta kañiwa: crecimiento ramificado, grano castaño
- Lasta ccoito: crecimiento ramificado, grano negro

De forma general, la raíz es pivotante, con múltiples ramificaciones finas. Las hojas y tallo se colorean en la madurez de amarillo, rosado, anaranjado, rojo o púrpura.

Posee inflorescencias en cimas terminales y axilares, cubiertas con follaje. Las flores son pequeñas, sin pétalos, que pueden ser de 3 tipos: hermafroditas, pistiladas y androestériles. El androceo está formado de 1-3 estambres, un gineceo con ovario súpero unilocular.

Las hojas son pecioladas, de forma romboide, trilobuladas y alternas. Se observan en la figura 7. Los peciolo son cortos y finos, láminas engrosadas miden de 1-3 cm de largo, en la parte superior se dividen en tres lóbulos, rara vez dentados, presentan 3 nervaduras bien marcadas en la cara inferior que se unen después de la inserción del peciolo.



**Figura 7.** Granos andinos: A) Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*); A1) flor hermafrodita, A2) flor masculina, A3) fruto; A4) Raíz; B) quinua; B1) flor hermafrodita, B2) Flor femenina; B3) Fruto; B4) Raíz. Fuente: Tomado de Wikipedia.

La semilla posee un diámetro desde 0,5 a 1,5 mm. Color de la semilla es castaño o negro, piriforme o ligeramente comprimido. Sin embargo el color del grano entero posee diferentes colores que van desde un negro brillante a un grano rojo, pasando por colores castaños. (Ver figura 8)



**Figura 8.** Colores de los granos de cañihua otorgados por PROINPA. Fuente: Elaboración propia con fotografías de la tesis.

Las variedades Lasta presentan un hábito de crecimiento con ramas laterales decumbentes que alcanzan la altura de las ramas centrales; no están diferenciadas con un tallo principal como en el caso de la quinua que es del mismo género. Debido a esta forma de crecimiento y desarrollo morfológico, las plantas tienden a una mayor cobertura de la superficie causando competencia entre plantas aledañas afectando su desarrollo vegetativo.<sup>40</sup>

Estas características morfológicas pueden explicar, de alguna manera, el bajo rendimiento de grano en las variedades Lasta. (Ver figura 9)



**Figura 9.** Cultivo de cañihua en etapa de madurez y post cosecha. Fuente:a. Extraído De sitio web y b.Fotografía de muestreo Equipo CEIQA.

Las variedades Saihua son de hábito de crecimiento recto con ramificaciones paralelas al tallo principal y no diferenciado. Sus ramas son más delgadas y sus hojas basales se caen cuando llegan a su madurez fisiológica. En el tercio superior mantienen mayor número de hojas y las flores están cubiertas de grandes brácteas dentro de las cuales se desarrolla hasta la formación del fruto, tal como es explicado por varios autores.<sup>40</sup>

En cuanto a las semillas, estas no presentan dormición y pueden germinar sobre la propia planta si cuentan con humedad suficiente. Por poseer maduración progresiva se produce pérdida y dispersión espontánea de la semilla, hecho que es característico de las especies silvestres. (Ver figura 10)



**Figura 10.** Cultivo silvestre de cañihua en el Altiplano Boliviano.  
Fuente: Muestreo del equipo del CEIQA, en depto. Oruro, junio 2010

Se conoce a la cañihua como el grano nutritivo de Los Andes que causa impresión por el tamaño diminuto que presenta y su alto valor proteico. El público común se refiere a ella como un cereal, pero en realidad es del mismo grupo botánico que la quinua; pudiendo ser considerada como parte de la hierba común del campo pero con características más resistentes que otros granos. Se explica que ésta sea la razón por la que éste grano tan diminuto haya resistido y sobrevivido hasta la fecha.

En cuanto a los aspectos ecológicos y fitogeográficos, este grano es indiferente a la duración de la luz de día y muestra adaptabilidad en diferentes ambientes (fotoperíodo). Requiere una humedad entre 500-800 mm de lluvias, sin embargo tolera períodos prolongados de sequía, es muy susceptible a la humedad extrema en la primera fase de desarrollo. La planta ya establecida es resistente al frío, soporta temperaturas de hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  durante la ramificación y hasta los  $28^{\circ}\text{C}$  si cuenta con humedad necesaria.<sup>40</sup> (Ver figura 11)



**Figura 11.** Cultivo de cañihua en el Altiplano Boliviano. Fuente: Extraído de Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. PROINPA.<sup>40</sup>

El problema del cultivo de cañihua se encuentra en su cosechado y desgranado el que es muy laborioso por el tamaño y calidad arbustiva y semi-arbustiva de la planta. Posterior a su cosecha, se debe realizar un venteo de los granos para obtener los granos comestibles (Ver figuras 12 y 13)



**Figura 12.** Cosecha de cañihua. Fuente: Extraído de Imágenes-Google



**Figura 13.** Venteo de los granos de cañihua. Fuente: Obtenido de viaje de muestreo Oruro, 2010 por el equipo del CEIQA.

La cañihua fue considerada por mucho tiempo como una variedad de quinua, sin embargo estudios cromosómicos confirmaron que ambas pertenecen a especies diferentes, la cañihua tiene una designación cromosómica de  $2n=2x=18$ , en cambio la quinua:  $2n=4x=36$ .

### 1.3.3. Composición proximal y nutricional de la cañihua.

La cañihua, estudiada y revalorizada actualmente por muchas investigaciones, muestra una calidad nutricional sin precedentes. Un resumen de datos estadísticos de las características nutritivas expresados en base seca en 90 accesiones de cañihua muestra la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Tabla de valor nutritivo-agroindustrial de 90 accesiones de cañihua.

Componente	Mínimo	Máximo	Media	SD
Proteína (%)	12.76	19	16.12	1.55
Grasa (%)	2.11	14.5	7.46	1.96
Fibra (%)	5.45	11.12	8.41	1.16
Ceniza (%)	3.12	5.77	4.29	0.58
Carbohidratos (%)	45.72	67.7	56.91	5.33
Humedad (%)	4.68	14.7	10.37	1.76
Energía (Kcal/100 g)	324.54	396.42	358.92	20.52
Gránulo almidón ( $\mu$ )	5.5	38	18.98	6.96
Azúcar invertido (%)	5	35	15.33	7.55
Agua de empaste (%)	9	39	20.18	6.21

Fuente: Elaborado por LAYSAA, Cochabamba, Bolivia.<sup>40</sup>

Estudios realizados por Blanco et al en granos de cañihua de cuatro departamentos estudiados en el país vecino del Perú, muestran valores de proteína entre 13,5 y 14,5 g/100 g de alimento. Además estos indican que 100 g de cañihua cubren el 25% de los requerimientos proteicos de un adulto promedio y casi el 100% de las necesidades de los aminoácidos esenciales estudiados.<sup>19</sup> (Ver Anexo 1)

De acuerdo a estudios de Ayala<sup>41</sup> (1999) y datos consignados por la FAO, OMS y ONU, la composición nutricional de la cañihua en comparación al arroz y trigo presenta un perfil proteico excelente mayor al de arroz y del trigo, 14%. Por otro lado realizada la diferenciación y comparación de cuatro aminoácidos esenciales en comparación a éstos mismos, se obtuvieron que el perfil es mayor a los de arroz y trigo, contando con lisina, metionina y treonina con valores mayores, solo se observa que el triptófano se encuentra levemente inferior. (Ver Anexo 2 y 3)

La presencia de ácidos grasos insaturados como los omega-3, omega-6 y omega-9 otorgan un perfil muy adecuado a este grano por sus características de antioxidante natural que permitiría mayor tiempo de conservación. (Anexo 4)

En el análisis de macro minerales, micro minerales y análisis proximal de variedades de maca, mashua (isaño), kiwicha y cañihua, se encontró valores de calcio, fósforo, potasio, magnesio, hierro, manganeso y zinc significativos (Anexo 5)

En el análisis proximal de las mismas muestras se reportó el valor hasta 13,46% para proteínas, 0.24% de grasas y 62.32% de carbohidratos. (Anexo 6) Otras investigaciones citan hasta un 8% de grasas.<sup>11</sup>

Es importante citar que la planta que produce los granos puede crecer en ambientes realmente inhóspitos para otro tipo de vegetales y granos, soportando altas latitudes, sobreviviendo heladas y sequías que serían muy nocivas para otras plantas.

Su alto contenido de calcio en las hojas, la convierte en un excelente forraje para los animales que también deben soportar altitudes de 3800 m sobre nivel del mar, en el altiplano de Los Andes.

Se estima que el 80% de los granos son digestibles por su alto contenido de fibra soluble y dietética, porque se conoce que en estudios realizados por Alencastre<sup>42</sup>, la cañihua cruda posee un 59.16%, la cañihua cocida: 64.18% y la cañihua germinada: 63.12% de digestibilidad.

El contenido de fibras en todas sus formas, le permite ser empleado en pacientes de la tercera edad, personas que siguen dietas especiales, etc. De acuerdo a datos de Repo-Carrasco, observamos los valores en g% de materia seca: 12.92% en muestra de grano, fibra insoluble 3.29% y fibra soluble 16.41%.<sup>11</sup>

Por otro lado, refiriéndonos a metabolitos secundarios como las saponinas, este grano posee un porcentaje bajo de ellas, que según el rango de saponina en quinuas (quinuas dulces) nos permite indicar que tiene una presencia minoritaria, ya que fueron aisladas y caracterizadas de forma paralela al estudio en este mismo trabajo. El resultado obtenido fue de 0.0019% de este analito según el método hemolítico para una de las muestras del universo con el que contamos. (Ver Anexo 7 y 8)

Valores menores a 0.2 mg% de saponinas permiten un consumo seguro de sus productos. Mientras la quinua, grano quenopodiáceo como la cañihua,

presenta valores de 0.00 hasta 2.8% reportados por Jacobsen et al. (1996), Tellería et al. (1978), el nivel máximo aceptable de saponina en la quinua para consumo humano oscila entre 0.06 hasta 0.12%, según estudios de Zabaleta; citados por Monje (2006) <sup>43</sup>

Una clasificación de las saponinas en quinua indica que entre 0-3% están en granos secos, donde granos muy amargos se clasifican entre 1 y 3%, granos de contenido medio entre 0.1 y 1% y variedades muy dulces de 0.0 a 0,1% (citado por Quiroga C, 2010) <sup>44</sup>

La Norma Boliviana NB NA 0038, establece niveles de consumo de saponinas menores a 0.02% en los alimentos. Las Normas Bolivianas que establecen criterios específicos en cuanto a las semillas de *Chenopodium pallidicaule*, están contempladas con los códigos: 336001 y 336002. <sup>44</sup>

Rastrelli et al<sup>13</sup>, aislaron siete saponinas triterpenoides de los granos de cañihua, que fueron identificadas como ácido oleanólico y ácido fitolacagénico. Los otros tres compuestos fueron nominados como saponinas 1, 2 y 3. Las estructuras de éstos fueron determinados como:

- Hederagenina 3-O- L-arabinopiranosil-(1 3)-D-glucuronopiranosil – 28-O- D-glucopiranosido.
- Acido fitolacagénico 3-O-[â-D-glucopiranosil- (1 4)-â-D-glucopiranosil]-28-O-â-D-glucopiranosido.
- Acido fitolacagénico 3-O-[â-D-glucopiranosil-(1 4)-â-D-glucopiranosyl-(1 4)-â-D-glucopiranosil]-28-O-â-D-glucopiranosido.

#### 1.3.4. Empleo de la cañihua

Los usos que se le daba desde la antigüedad hasta el momento proceden posteriores al desgranado de los arbustos y limpieza de los granos. Estos son diversos:

- **Pito de cañihua tostada o kañihuaco:** a partir de la cosecha y su venteado para eliminar los perigonios desprendidos se procede a su tostado y molido hasta obtener una harina de color marrón con aroma y gustos deliciosos por la composición que tiene.



**Figura 14.** Tostado de los granos y harina de cañihua tostada: kañihuaco. Fuente: Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. PROINPA.

Pokorny et al (2001)<sup>45</sup> mencionaron el efecto positivo de los flavonoides vegetales en la salud del corazón al experimentar en diversos pacientes.

Se examinó pacientes del Hospital Regional Honorio Delgado (Perú) que padecían enfermedades cardiovasculares relacionadas a hipercolesterolemia y se observó la influencia positiva de la ingestión de cañihua sobre el perfil lipídico y riesgo cardiovascular en estos pacientes hipercolesterolémicos primarios (1994-2001), citado en Revista de Cardiología, 2003.<sup>46</sup> Este producto viene siendo sugerido como parte del

tratamiento de enfermedades cardiovasculares por el médico Roberto Botazzi.

- **Expandidos:** La agroindustria promueve el uso de la cañihua como expandido con dulces saborizantes y chocolates, aunque algunos usos podrían disminuir su valor nutricional por las interacciones no convenientes en su transformación, que requieren ulterior investigación.
- **Harinas:** La harina también se emplea en combinación con harina de trigo para la preparación de pan, pasteles y diferentes masas que de esta manera es fortificada y la tornan un alimento funcional.
- **Otros usos:** de uso de la cañihua son como ingrediente de licuados con frutas y leche, aumentando la calidad nutricional de los mismos.
- **Bebida:** Por otro lado es importante mencionar que como bebida, endulzada convenientemente es muy refrescante y energética. Ya mencionamos que el gusto aromático que posee se debe a la cantidad significativa de ácido vainílico.
- **Forraje:** El uso de la cañihua, no se limita al consumo humano, ya que debido a su gran valor nutricional se emplea como forraje, a pequeña escala, para el consumo de algunos animales. Los tallos secos y la broza posterior a la cosecha de estos granos son un subproducto apreciado para la alimentación animal que es utilizado por todos los agricultores.
- **Polvillo de cañihua:** En este caso se conoce el polvillo de la cañihua, producto residual obtenido posterior al limpiado y golpeado del grano, que al no contener saponinas como el polvillo de quinua tiene uso

inmediato. Pudiendo emplearse en la crianza de animales como el cuy. Justamente en una investigación realizada sobre la alimentación de cuyes en crecimiento se encontró que una combinación de éste producto en diferentes porcentajes (40% de polvo de cañihua), junto a otros alimentos como harina de maíz, soja, etc. dio buenos resultados porque permitió una ganancia de peso significativo de acuerdo a las concentraciones empleadas, asimismo el ingreso económico que reporta la venta de estos animales, justificó grandemente el uso del mismo. (Cortés H y Johnston P., 2007)<sup>23</sup>

- **Extruidos de cañihua:** Mostraron buenas propiedades funcionales, el precipitado presentó alto valor en componentes bioactivos como compuestos fenólicos totales, responsables de la capacidad antioxidante. Se estudió el extruido de este grano. Las propiedades observadas en el extruido son: grado de gelatinización, densidad, índice de expansión seccional y el índice de solubilidad en agua, muy importantes para considerar a este grano como alimento funcional. Por lo tanto es una alternativa a los cereales tradicionales como ingrediente promotor de la salud.
- **Salvado:** El estudio de las propiedades nutricionales y funcionales y sus usos potenciales, según Repo Carrasco muestra que dos variedades estudiadas mostraron presencia de fibra dietaria y fracción insoluble importante, además de la capacidad antioxidante ya conocida. En cuanto al estudio del salvado, se observó un tamaño grande y otro pequeño ambas con buenas propiedades funcionales. El salvado es una fracción indigerible que puede ser empleado en alimentos funcionales, porque además posee contenido alto de fenoles.<sup>11</sup>

### 1.3.5. Mercado Nacional e Internacional

Actualmente, gracias entre otros a la contribución de los estudios científicos realizados, el mercado norteamericano, el europeo y otras áreas industrializadas han cobrado interés en este grano, cuya productividad y cultivo mecánico debe ser mejorado para permitir su salida del estado de olvido al que fue sometido.

Los granos andinos, también llamados “granos de oro” (sobre todo la Quinoa, y el Amaranto) han sido clasificados como los mejores alimentos de origen vegetal para los seres humanos por lo que han sido seleccionados por la NASA (National Aeronautics and Space Administration, USA) para su empleo en la dieta de los astronautas (citado por Rojas, 2010) <sup>40,47</sup>

El Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI) con el apoyo financiero del Fondo Internacional para el Desarrollo Agrícola (IFAD) ha venido trabajando en un proyecto global donde se estudió la situación actual de especies olvidadas, subutilizadas, y las posibilidades para su mejora con diferentes protagonistas (centros de investigación, universidades, ONG s, agroindustrias, grupos de agricultores). En la región andina, se estudiaron especies como cañihua, quinua, amaranto y tarwi.

Biodiversity Internacional es el nombre de la organización bajo el cual opera el IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos) que ha estado colectando germoplasma de todas las especies. Se conocían resultados de granos andinos para el año 2002, donde Bolivia colectó hasta 50 accesiones de amaranto, 107 accesiones de quinua, 59 accesiones de cañihua y 582 accesiones de cañihua del Perú. Justamente gracias a éste conocimiento planificado se deriva una mayor capacidad de comercialización y valorización de estas especies olvidadas y subutilizadas.<sup>48</sup>

De acuerdo a una publicación de la entidad gestora en nuestro país del control y desarrollo de los granos andinos (PROINPA) se conoce que gracias a programas de Fortalecimiento se ha contribuido al uso de estas especies de granos, uniendo a todos los actores interesados que mejora la interacción entre productores, ONGs, extensionistas, investigadores y compradores.<sup>40</sup>

En el II Congreso Iberoamericano sobre Desarrollo y Medio Ambiente, desarrollado en el país de México, 2005, se presentó la ponencia que titulaba “Revalorizando y difundiendo la producción y consumo de cañahua” , donde se valoró la calidad nutricional de la cañihua y se presentó el Análisis ciclo de Vida, que se aplicó sobre este, procedimiento de evaluación objetiva de las cargas energéticas y ambientales que proceden de su cultivo, a partir de la identificación de los materiales y energía empleada, además de los descartes liberados en el ambiente natural que fue positivo para este grano.<sup>49</sup>

### **1.3.6. La cañihua en el Banco de Germoplasma**

Los bancos de germoplasma son entidades esenciales en la conservación de los recursos filogenéticos de cualquier país, mucho más cuando este es sitio geográfico original de una especie en particular. Además de ser patrimonio ancestral, cultural, se torna en una responsabilidad no solo para el estado, sino mundial, porque con ello se garantiza la seguridad alimentaria de generaciones de habitantes.

Lastimosamente no siempre las políticas internas gubernamentales otorgan los requerimientos que estos bancos necesitan para la preservación de cantidades de especies nativas. Sin embargo, Instituciones como PROINPA y ahora INIAF junto a entidades extranjeras y locales han coadyuvado al establecimiento final de varios bancos de germoplasma donde se conservan granos de *Chenopodium pallidicaule*. Las condiciones para su conservación en

el banco son: tamaño de grano, semilla viable y características de resistencia al desgrane.

Una colecta de germoplasma es necesaria y justificada en centros de origen y sitios de domesticación de especies, donde se encuentran variedades y especies silvestres que evolucionan en el tiempo. Bolivia es considerada como uno de los ocho centros de origen de especies en el mundo con gran riqueza genética de especies.

Todos los granos conservados en los bancos de germoplasma de nuestro país han sido categorizados como accesiones, y hasta el 2010 se cuenta con 788 accesiones bolivianas, recolectadas en los departamentos de La Paz, Oruro, Cochabamba y Potosí.

Dichas accesiones, actualmente, se encuentran bajo el cuidado del INIAF, entidad que recibió de PROINPA todo lo referente al Banco de Germoplasma. Cada una de las semillas guardadas en el Banco, posee un Formulario donde se recaban todos los datos referentes que puedan servir para un futuro.<sup>40</sup>

### **1.3.7. Capacidad antioxidante**

#### **Efecto oxidante Vs Patologías Humanas**

Desde el punto de vista molecular, el efecto oxidante de los radicales libres es oxidar y causar envejecimiento al combinarse con moléculas esenciales, como el DNA y las proteínas a las cuales desactivan. Un ejemplo son las moléculas oxidantes con función aldehído que producen anclajes en el colágeno y otras macromoléculas determinando pérdida de la flexibilidad de los tejidos. Otra consecuencia es la impregnación por pigmentos de órganos

vitales. Estos compuestos lipídicos (lipofucsina) incrementan con la edad e interfieren en las funciones celulares.

Según estudios de Zorrilla (2002), el envejecimiento y la disminución de la longevidad se debe en parte a la acción de los oxidantes o radicales libres, quienes provocan alteraciones oxidativas en el colágeno, elastina y DNA, ruptura de mucopolisacáridos por degradación oxidativa y acumulación de sustancias metabólicas como ceras y pigmentos.<sup>50</sup>

Las sustancias oxidantes tienen efectos devastadores sobre los ácidos nucleicos, debido a que producen hidroxilación de bases nitrogenadas, escisión de hebras de ADN y formación de uniones cruzadas. Todo esto ocasiona alteraciones en la duplicación y transcripción que repercutirá en la asociación de generación de radicales libres de oxígeno con la carcinogénesis y el envejecimiento. Se ha propuesto que las ROS causan ruptura del ADN y esto activa a las poli (ADP-ribosa) sintetasa, que eliminaría el cofactor NAD<sup>+</sup>(Nicotinamin, adenin di nucleótido oxidado), y que la enzima gliceraldehído-3-P deshidrogenasa no podría actuar en la ruta glucolítica, por lo tanto al inhibirse la glicólisis, se corta la cadena transportadora de electrones disminuyendo la producción de ATP intracelular, desencadenando problemas a nivel de cualquier tejido donde se produzca esta inhibición hasta la muerte celular por falta de energía para su funcionamiento normal.

De acuerdo a estudios de Sunny (2005), existe evidencia de reducción de riesgo de cáncer de próstata por empleo de una dieta saludable. Se realizó un estudio de casos durante 1998 a 2000 en el Registro de Población con Cáncer de Bombay, India. Se observó que el consumo de más de 3 kg de frutas y vegetales ofreció un efecto protector estadísticamente significativo que los que consumieron menos de 2 kg por semana, soportando así la hipótesis que una

dieta baja en grasa y rica en frutas y vegetales puede reducir el riesgo de cáncer de próstata.<sup>51</sup>

Para la prevención o disminución del estrés oxidativo, se recomienda el consumo de alimentos ricos en antioxidantes como frutas y vegetales, citado por Van Dokkum et al, 2008. Estudios epidemiológicos sugieren que culturas con dietas ricas en productos de soya, tienen una prevalencia baja en enfermedades crónicas que otras naciones con diferentes hábitos alimentarios. (Sarria, 2004). Mencionados por de la Rosa (2010)<sup>52</sup>

De acuerdo a investigaciones de Suzuki et al (1991), la quercetina un flavonoide de frutas y vegetales exhibió un efecto potencial contra la metástasis de células tumorales de ratón.<sup>53</sup>

Las sustancias oxidantes también afectan un órgano importante del SGI (Sistema Gastrointestinal) el estómago, reportándose una relación inversa entre el consumo de vegetales frescos y cáncer gastrointestinal, estudio realizado por Botterweck et al (1998).<sup>54</sup> En un estudio realizado en 214 mujeres con cáncer de color y 182 mujeres con cáncer de recto se encontró que un incremento de riesgo de cáncer de color estuvo asociado con disminución en la frecuencia de consumo de vegetales, Graham et al, (1978)<sup>55</sup>

De la investigación realizada por Dosil-Díaz et al (2008), acerca de consumo de frutas y vegetales con pacientes con riesgo de cáncer de pulmón en una población del Noroeste de España, se encontró que el consumo de vegetales confiere un efecto protector de esos órganos importantes.<sup>56</sup>

En cuanto a la relación de consumo de vegetales y la diabetes, podemos inferir que el efecto oxidante produce alteraciones metabólicas como es el caso de la diabetes, las que se pueden controlar por el consumo de frutas y

vegetales, investigaciones apoyan esta conclusión (Nettleton et al, 2008, Bazzano et al 2008).<sup>57,58</sup> Algunos flavonoides como las procianidinas tienen propiedades antidiabéticas porque estimulan a la glucosa alterada y el metabolismo oxidativo de estados diabéticos según estudios de Pinent et al (2004).<sup>59</sup> El extracto de uva con procianidinas administrado oralmente a ratas diabéticas resultó tener un efecto antihiper glucémico muy significativo.

Mecanismos oxidativos han sido implicados en la etiología de cataratas en humanos y los estudios mostraron que sustancias antioxidantes vegetales pueden dar una mejora a este proceso patológico, de acuerdo a Burke et al (2005).<sup>60</sup>

El estrés oxidativo y la inflamación son considerados mediadores significativos en la edad saludable del cerebro y en enfermedades neurodegenerativas relacionadas a la edad como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Shukitt-Hale et al, 2006).<sup>61</sup> Estudios animales y humanos sugieren que las frutas y vegetales tienen la capacidad de disminuir algunos procesos relacionados al envejecimiento debido a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de ciertos compuestos fitoquímicos. En un estudio *in vitro* se sugirió que algunas clases de fitoquímicos también actúan en marcar células y darles protección contra el envejecimiento por mecanismos diferentes que el oxidativo y los procesos antiinflamatorios. (William et al, 2004)<sup>62</sup>. Los extractos de frutas y vegetales demostraron revertir o retardar varios agentes cognitivos y déficit motor relacionados a la edad en ratas. (Lau et al, 2005)<sup>63</sup>. Extractos de frutillas y espinacas atenuaron problemas cognitivos y declinación neuronal en ratas con 6–15 meses, y los extractos de arándano fueron efectivos en revertir estos problemas mejorando la función motora en ratas adultas. (Joseph et al, 2005)<sup>64</sup>. El examen de tejido cerebral de estos animales mostró evidencia de reducción de inflamación y procesos oxidativos en grupos suplementados. Un modelo transgénico de ratón con enfermedad de Alzheimer alimentado con

extracto de arándano exhibió un desarrollo cognitivo equivalente a un ratón normal no suplementado y fueron significativamente mejorados comparados a un grupo no suplementado de ratones transgénicos (Joseph et al. 2003).<sup>65</sup>

## Radical libre, RL

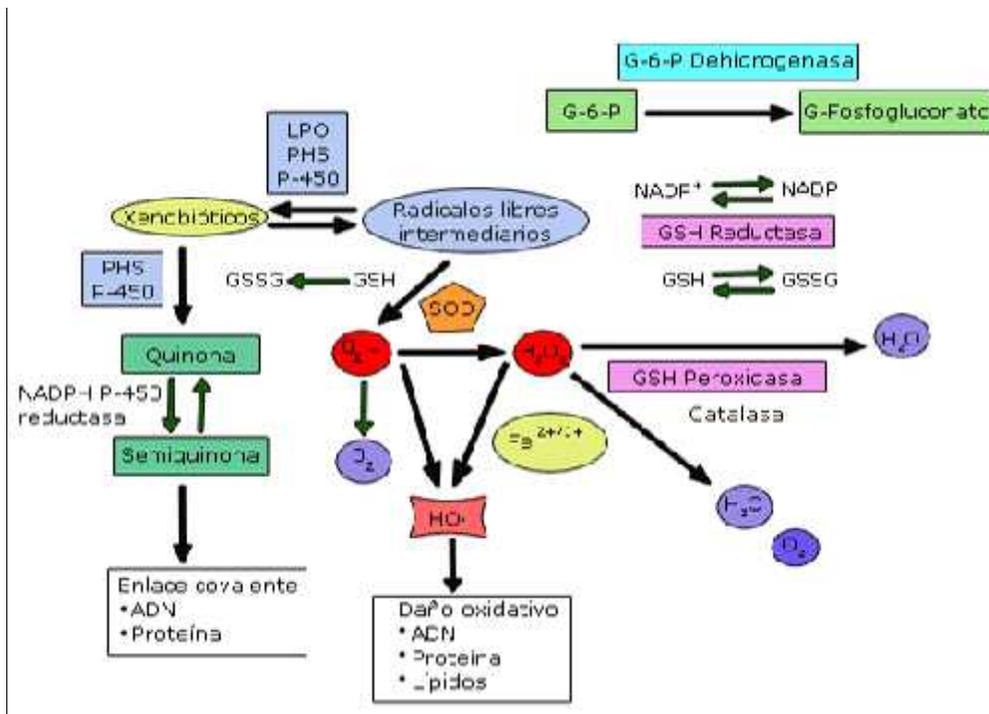
Los radicales libres son moléculas de oxígeno o nitrógeno con electrones desapareados que son originados por un número de procesos metabólicos en el cuerpo humano. Estos son producidos por efecto de reacciones de oxidación propios del metabolismo. Un ejercicio vigoroso eleva la producción de estos radicales libres como también la inflamación, exposición a ciertos químicos, el humo del cigarrillo, alcohol, el aire contaminado y las dietas ricas en grasas. En la tabla 4, se observa estos radicales libres producidos a consecuencia del metabolismo por diversos efectos.

**Tabla 4.** Radicales libres y su fórmula química.

RADICALES LIBRES	
Hidroxilo	OH•
Peroxilo	ROO•
Hidroxiperoxilo	HOO•
Superóxido	O <sub>2</sub> •
Oxido nítrico	NO•
Alcoxilo	ROO•
Dióxido de nitrógeno	NO <sub>2</sub> •

Fuente: Elaboración propia

Cuando un radical libre reacciona con otra molécula, se crea un nuevo radical libre. Estas reacciones ocurren frecuentemente en o cerca de la membrana celular y puede dañar la integridad de la célula interna. Las moléculas diana de los radicales libres son: lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos. En la figura 15 observamos las vías de formación de EROs, reguladas por varios procesos enzimáticos que regulan los mecanismos endógenos de defensa antioxidante.<sup>66</sup>



**Figura 15.** Producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo.  
Fuente: Extraído de Nuñez,<sup>66</sup>

Algunos radicales libres tienen como blanco a la mitocondria, organelo importante del metabolismo celular, afectando así su capacidad de producción de energía. Otros radicales libres son selectivos y atacan el ADN.

Es concluyente indicar que los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno causan daño celular, inflamación y promueven crecimiento celular anormal, incluyendo muchos tipos de cáncer. Los antioxidantes pueden prevenir el daño por combinación con radicales libres y neutralizándolos.

### Molécula antioxidante

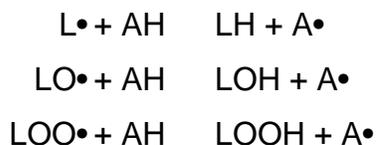
Un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que cuando está a bajas concentraciones comparada con otros sustratos oxidados exhibe acción significativa o inhibe la oxidación del sustrato. Los antioxidantes son

moléculas que interrumpen un flujo de electrones desapareados reaccionando con especies inestables (por ejemplo: NO•, OH•, O2•), convirtiéndose a su vez en radicales menos reactivos. Para ello buscan los enlaces intramoleculares más próximos como fuente de electrones y así formar pares de electrones más estables. La disponibilidad de electrones desapareados es menor cuando existe la resonancia debido a que impide fijar el electrón en una posición y así reaccionar con otra molécula biológica

Por conveniencia los antioxidantes han sido divididos en tres clases:

- a. Antioxidantes primarios o antioxidantes que rompen la cadena
- b. Antioxidantes secundarios o antioxidantes preventivos.
- c. Antioxidantes terciarios

Los del primer grupo tienen el siguiente mecanismo:

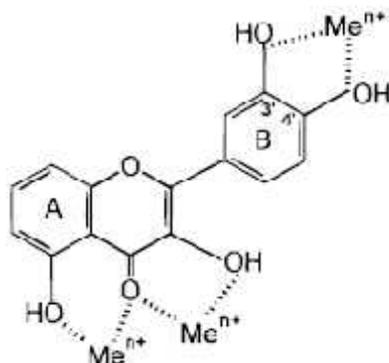


Se inicia el radical por reacción con un radical lipídico L•, una propagación por reacción con radicales: un grupo alcoxi LO• o grupo peroxilo LOO•, pasos que son inhibidos por el antioxidante AH.

Por el otro lado, los antioxidantes secundarios o preventivos retardan el grado de oxidación, son agentes quelantes que desactivan los metales, son removedores de ROS, son atrapadores de oxígeno singlete. Por ejemplo, los metales quelantes pueden inhibir reacción tipo Fenton que produce radicales hidroxilos. Según la reacción:

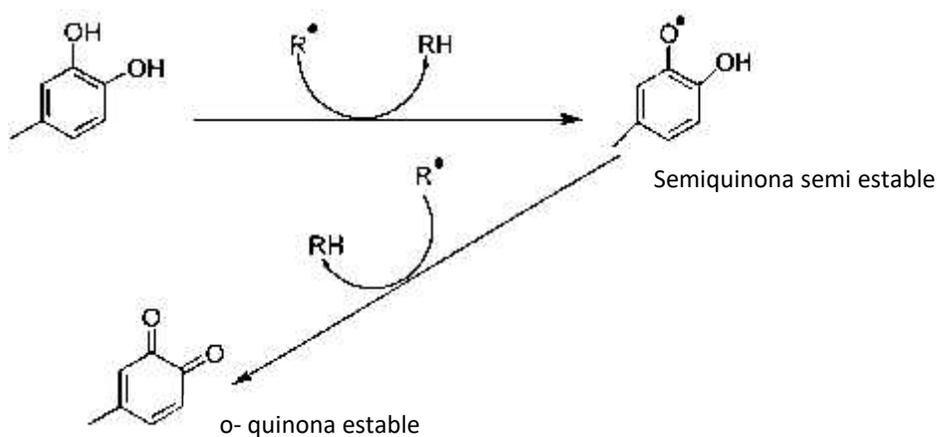


La quelación de metales también se observa en la siguiente estructura aromática que gracias a los grupos hidroxilo formarán enlaces débiles con el metal.



**Figura 16.** Reacción de captura de metales por estructuras flavonoides. Fuente: Tomado de Tiwari A. (2001).<sup>4</sup>

El mecanismo del atrapamiento de radicales también sigue este patrón de reacciones:



**Figura 17.** Mecanismo de reacción de atrapamiento de radicales. Fuente: Tomado de Tiwari A. (2001).

Una importante función de los antioxidantes hacia radicales libres como  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$  es la supresión del radical libre oxidado por inhibición de la formación de radicales libres y/o por captura de radicales. La formación de estos radicales libres puede ser inhibida también por reducción de

hidroxiperóxidos, peróxido de hidrogeno y por secuestro de iones metálicos mediante reacciones de quelación/complejación.<sup>65</sup> La acción de secuestro de radicales es dependiente de ambas reacciones y concentración del antioxidante.

Los antioxidantes terciarios tienen la particularidad de reparar biomoléculas dañadas por los ataques mediados por radicales libres.

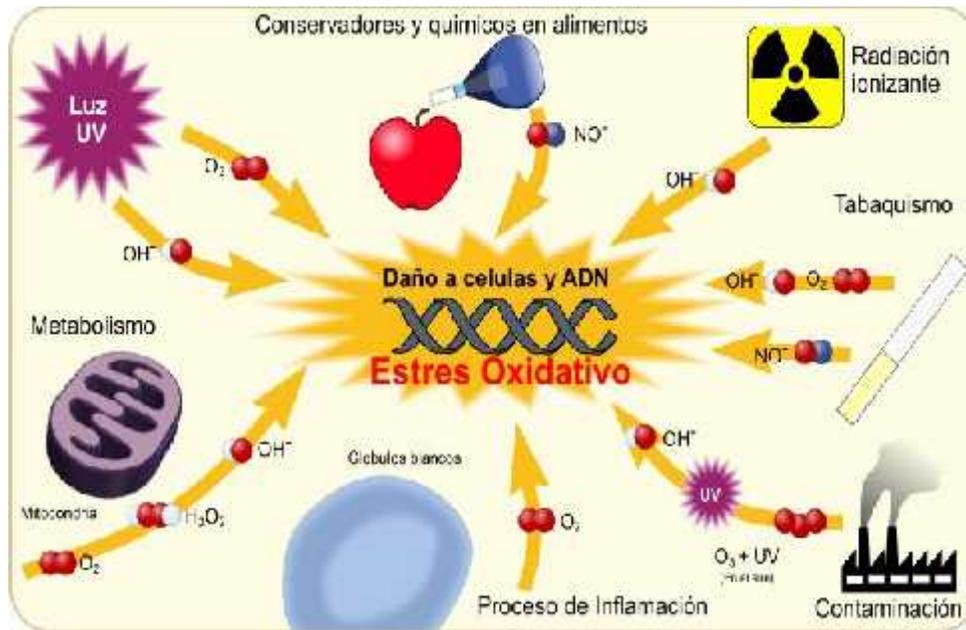
### **Efecto antioxidante**

En el afán de mantener el control y evitar el daño celular, el cuerpo produce varios antioxidantes naturales, que son compuestos que buscan los radicales libres y desintoxican los mismos por otorgar el electrón que les falta. Alimentos con base vegetal contienen estos antioxidantes que se complementan con los antioxidantes producidos por el organismo. Los antioxidantes se pueden clasificar en los grupos:

- Enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSX-PX), transferasa (GST)
- Antioxidantes de alto peso molecular: Albúmina, ferritina
- Algunas hormonas: Angiotensina, etc.
- Antioxidantes de bajo peso molecular: Fenoles, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico.
- Elementos minerales como el selenio, el zinc, etc.

Siendo los tres primeros de defensa endógena y los últimos, como defensa exógeno. Todos ellos confluyen en el control de la presencia de sustancias oxidantes que son generadas a lo largo del metabolismo propio de un sistema biológico, sin embargo su cantidad se ve incrementada por la presencia de los radicales del ambiente, como se explicó líneas arriba.

La figura 18 muestra como la polución ambiental ingresa en la producción de radicales libres que llegan a incrementar los ya producidos por el organismo en sus múltiples reacciones metabólicas.



**Figura 18.** Fuentes de efectos oxidantes que producen Estrés Oxidativo.

Fuente: [blogspot.com/2012/04](http://blogspot.com/2012/04)<sup>67</sup>

Las que a su momento son controlados por los sistemas enzimáticos mencionados (GSX, SOD, etc.), y los agentes exógenos: Flavonoides, Fenoles totales, vitamina E, Vitamina C, -caroteno, oligoelementos: Selenio. Muchos de estos compuestos exógenos son parte del sitio activo de los sistemas enzimáticos mencionados, formando todo un complejo sistema entre endógenos y exógenos.

### **Métodos de determinación de Actividad Antioxidante Total**

La medición de los antioxidantes o la determinación cuantitativa de Actividad Antioxidante es complicada porque la bioquímica de los antioxidantes es compleja. Las plantas tienen múltiples mecanismos para producir y

metabolizar antioxidantes que los animales también poseen. La diversidad de metabolitos secundarios polifenólicos refleja diferencias en su estructura esquelética de carbono de moléculas fenólicas, tanto como las diferencias en su estado oxidado. A esto debemos añadir que los antioxidantes en la comida y en las personas están continuamente cambiando en forma y función como resultado de la glucosilación, hidroxilación y anillos fenólicos aromáticos, a través de la polimerización como resultado de la síntesis de varios estereoisómeros.

Los ensayos de Actividad antioxidante existentes y empleados se basan en solo dos mecanismos:

- a) Transferencia de electrón (ET)
- b) Transferencia del átomo de hidrógeno (HAT)

Los métodos que se basan en ET, miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante que cambia de color cuando está en forma reducida. Los ensayos por ET incluyen los métodos ABTS/TEAC, CUPRAC, DPPH, Folin –Ciocalteu y FRAP, empleando diferentes reactivos cromogénicos redox con diferentes potenciales estándar. La prueba de Folin Ciocalteu trabaja en medio alcalino y la de FRAP en medio ácido.<sup>31,32</sup>

La mayoría de los ensayos del segundo grupo son cinéticos y se fundamentan en esquemas de reacción competitiva donde antioxidante y sustrato compiten por radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de azo-compuestos.

Los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad; algunos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales

iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete y fuentes de radicales libres.

La evaluación de actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de RLs en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación.

Este es el principio de las técnicas más modernas tales como los ensayos de ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), o la de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).<sup>68</sup>

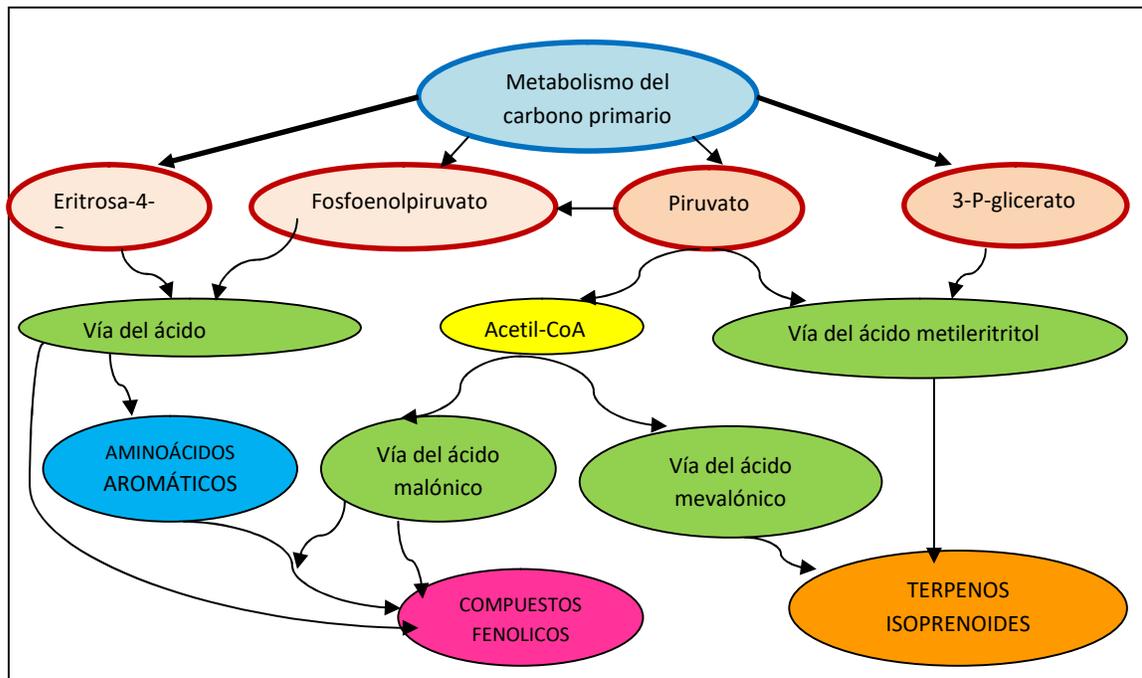
De hecho, en la mayoría de los ensayos basados en la Transferencia de Electrones (ET), la acción antioxidante se simula con un muestra de prueba de potencial redox, es decir, los antioxidantes reaccionan con una muestra de prueba coloreada (agente oxidante).<sup>69</sup>

### **1.3.8. Compuestos vegetales con efecto Antioxidante**

#### **Fenoles**

Los compuestos fenólicos son un grupo diverso de moléculas que incluyen a los flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y lignina. De los cerca de 10 mil compuestos encontrados en plantas, algunos son solubles en solventes orgánicos, otros en agua y otros polímeros son prácticamente insolubles. Su síntesis procede de diferentes vías y se reúnen en un grupo metabólico común. Su diversidad estructural química permite funciones variadas dentro de la planta que lo contiene. Algunas son un soporte mecánico, otras son protectoras de la

radiación UV solar y de la excesiva pérdida de agua. Los compuestos fenólicos por su concentración son segundos después de la celulosa, especialmente se cuenta con la lignina hasta casi un 40%. Esta tiene un rol de protección estructural, entretanto que suberina y cutina protegen a la planta de la pérdida de agua. La figura 19, muestra la vía metabólica común de producción de éstos compuestos fenólicos, como productos del metabolismo del carbono primario.



**Figura 19.** Panorama de las principales vías biosintéticas que producen metabolitos secundarios. Fuente: Elaboración propia basado en De la Rosa<sup>52</sup>

Compuestos fenólicos simples incluyen:

- Fenilpropanoides: ácido trans-cinámico, p-cumárico y sus derivados
- Lactonas fenilpropanoides llamadas cumarinas
- Derivados del ácido benzoico donde 2 carbonos fueron clivados de una cadena de 3 carbonos. Moléculas más complejas derivan de esta como el ácido clorogénico.

Las cumarinas poseen un efecto defensivo de las plantas. Los lignanos y la lignina derivan de una dimerización de monolignoles que son compuestos

defensivos contra bacterias y hongos. Los monolignoles son alcohol 4-cumarico, alcohol coniferil y alcohol sinapil. Se conoce que algunos lignanos, como la podofilotoxina han sido empleados para combatir el cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.<sup>52</sup>

La lignina es un componente integral de la pared celular de plantas vasculares que por oxidación de los monolignoles forma puentes intermolecular al azar, esta polimerización forma una matriz con la celulosa y las proteínas y la pared celular, por lo tanto su ataque enzimático es dificultoso y pocos organismos lo pueden degradar, como si se asemejara a un concreto reforzado.

La suberina y la cutina son compuestos cuya función es evitar la pérdida de agua de las plantas. La diferente proporción de ácidos grasos, alcoholes grasos, ácido grasos hidroxilados y ácidos di carboxílicos varían en la suberina y cutina. La cutícula es sintetizada por la epidermis. Las capas hidrofóbicas que contribuyen a la cutícula son moléculas fenólicas combinadas con polímeros lipídicos. Estas capas poseen efecto impermeable tanto a gases como el agua para evitar la desecación de la planta, asimismo evitan una gran absorción de dióxido necesario para la fotosíntesis y oxígeno necesario para la respiración.

Las plantas son organismos capaces de responder al estrés biótico y abiótico. Muchos efectos de estrés ocurren naturalmente y la respuesta metabólica inducida por estrés produce una adaptación en la naturaleza y puede resultar en un producto de reducida calidad y la presencia de decoloración o formación de pigmentos como respuesta a un daño o estrés. La exposición a señales de estrés volátiles como etileno y ácido jasmónico pueden inducir la síntesis y acumulación de altos niveles de compuestos fenólicos.

Los métodos para cuantificar compuestos fenólicos en plantas tienen un principio basado en los grupos estructurales presentes en los compuestos

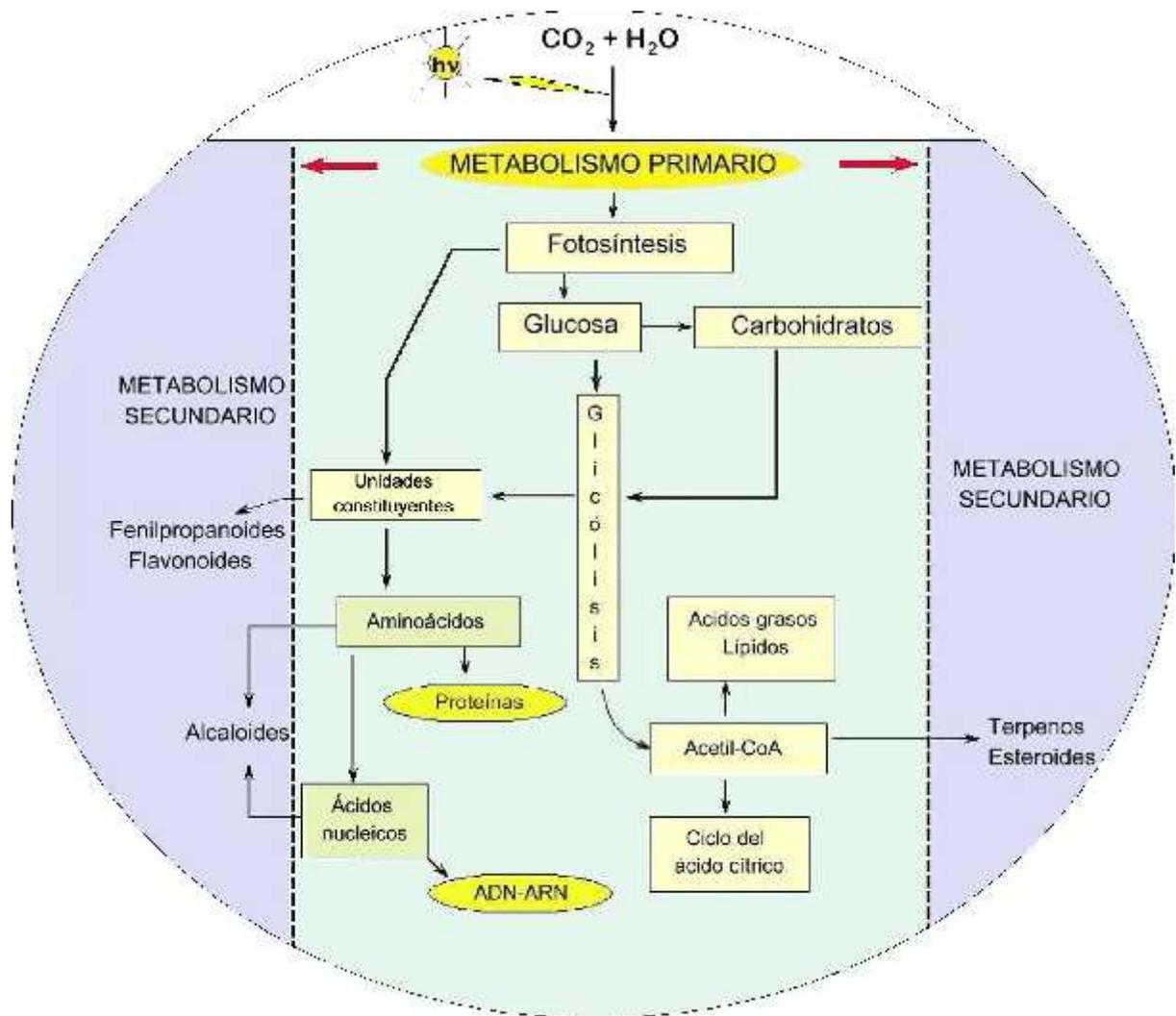
fenólicos. Métodos espectrofotométricos determinan como grupo y otros determinan sustancias fenólicas específicas como sinapina o una clase de fenólicos como ácidos fenólicos, explicados por Marshall et al (2008), Ismail et Eskin (1979) y Brune et al (1989), citados por de la Rosa<sup>52</sup>

Los polifenoles son una gran variedad de diversas estructuras que ocasiona la dificultad de estimar el contenido de fenoles totales en frutas y vegetales. Las frutas con alta concentración son las fresas y uvas con valores mayores a 180 mg de GAE/100 g de fruta fresca y vegetales con altas concentraciones son la alcachofas, perejil y coles de Bruselas con valores mayor a >250 mg de GAE/100 g de muestra fresca, melones y paltas tienen las concentraciones más bajas de polifenoles según estudios de Brat et al (2006) citado por de la Rosa<sup>52</sup>.

## **Los flavonoides**

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto, su anillo A proviene de la ruta de la malonil-CoA y el anillo B junto a la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shikímico. La figura 20, nos permite observar el origen de las estructuras químicas mencionadas como producto del metabolismo secundario que originan los diferentes flavonoides.

Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas verdes (especialmente angiospermas). Se encuentran en diferentes partes de las plantas, y de forma libre, llamadas agluconas flavonoides, o como glucósidos, como sulfatos y hasta dímeros y polímeros. De las formas naturales, los O-glucósidos son los más comunes de hallar. Los flavonoides se clasifican en varias clases de acuerdo con variantes estructurales que presenta la cadena central C3.<sup>71</sup>



**Figura 20.** Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de las plantas. Fuente: Avalos A, Pérez-Urria E, 2009.<sup>70</sup>

Los flavonoides son fenilpropanoides con estructura de 2 cuerpos aromáticos, uno que procede del aminoácido fenilalanina y la condensación con 3 ácidos malónicos. La chalcona es convertida a naringenina por la enzima chalcona isomerasa que es una enzima llave en la síntesis de flavonoides. A partir de la naringenina se forman cuatro grupos grandes de flavonoides: antocianinas, flavonas, flavonoles y las isoflavonas. Todas difieren por el grado de oxidación de su unión de 3 carbonos.

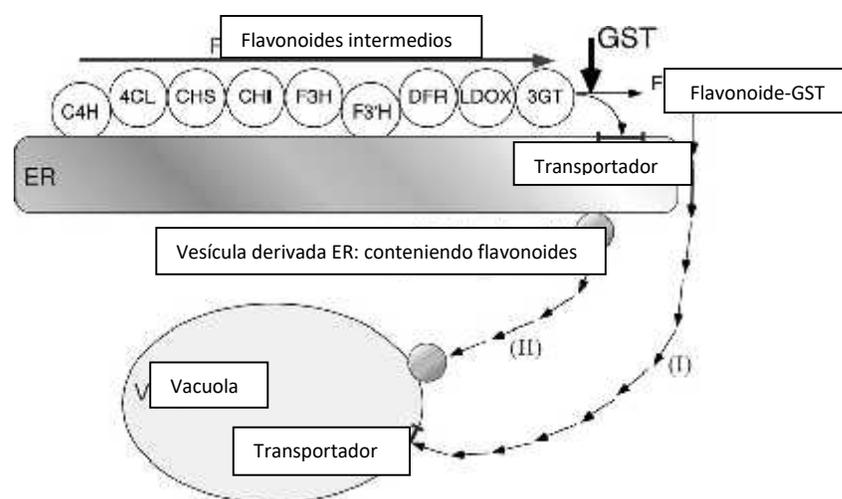
- Las antocianinas: son flavonoides coloreados que pueden atraer animales cuando una flor está lista para la polinización o lista para comer. Son glucósidos cuyos colores van del rojo, rosado, lila y azul dependiendo del número de sustituyentes en el anillo B y la presencia de residuos ácidos. Cuando se encuentran en complejo con un metal presentan un pigmento diferente.
- Las flavonas y flavonoles son dos grupos grandes de flavonoides que absorben luz de longitud de onda pequeña que la visible. Los insectos como la abeja pueden ingresar al espectro UV y ser atraídos por ciertos patrones de pigmentos en algunas flores. La presencia de estos dos grupos de pigmentos en hojas de las plantas proporciona protección contra la radiación excesiva por luz UV-B (280 a 320 nm). Los flavonoides juegan también un papel en el desarrollo y su secreción en la tierra cerca de las raíces de legumbres facilita una simbiosis con las bacterias para fijar nitrógeno.
- Las isoflavonas se diferencian por tener un anillo B trasladado. Tienen una limitada distribución taxonómica por ello se encuentran principalmente en legumbres. Debido a su estructura química posee un amplio rango de modificaciones inusuales, pudiendo tener efecto venenoso como la rotenona en animales por el consumo de ciertas legumbres. Otras poseen actividad estrogénica. Un efecto muy importante es su actividad anti cancerígena, presente en alimentos preparados de granos de soja. Otras isoflavonas poseen actividad antimicrobiana y son sintetizadas como respuesta al ataque microbiano.

52

Las propiedades físicas de los flavonoides dependen del tipo de flavonoide. Las flavonas, flavonoles y auronas son sólidos con colores que van del amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso,

morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles presentan rotación óptica, y los glucósidos son generalmente sólidos amorfos, entretanto que las agluconas y los muy metoxilados son cristalinos.

El metabolismo de los compuestos flavonoides es complejo pero presenta un orden para su realización precisando de transportadores para su ingreso a organelos donde serán procesados y originarán nuevos compuestos. La figura 21 muestra una propuesta de las vías metabólicas que se siguen.



**Figura 21.** Propuesta de mecanismos de transporte de flavonoides. Fuente: Extraído de Grotewold, E, 2006 .<sup>71</sup>

El esquema general de vías metabólicas de fenilpropanoides y flavonoides presenta subdivisiones con productos flavonoides: antocianinas, taninos condensados, isoflavonas, fitoalexinas de isoflavonas, fitoalexinas de 3-desoxiantocianidina, factores de Resistencia, flavonoles y auronas. Estos productos presentan pigmentos cuyas reacciones sintéticas han sido catalizadas por enzimas como: cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-cumaroil: CoA-ligasa (4CL), chalcona sintasa (CHS), chalcona reductasa (CHR), chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), flavonoide 3- hidroxilasa (F3 H), flavonoide 3,2,5-hidroxilasa (F3 5 H), glucosiltransferasa (GT), 3-glucosiltransferasa (3GT).

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, que se descomponen por acción de las bases fuertes, hecho que permite su reconocimiento y diferenciación que permite una elucidación estructural.

En el metabolismo de los flavonoides, la mayoría de estos son degradados en condiciones alcalinas fuertes rompiéndose el anillo C. Por esta razón resultan no tóxicos para el hombre y los mamíferos pues son degradados en las condiciones alcalinas a nivel del intestino.

La actividad biológica de los flavonoides se muestra en las últimas evidencias experimentales que sugieren que cumplen una o varias de las siguientes funciones:

- Su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta, los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, y además se ha sugerido que participan en el proceso de la fotosíntesis.
- Sus variados colores y su presencia en tejidos como los de las flores, sugieren que participan en procesos como la reproducción favoreciendo la atracción de insectos polinizadores.
- Las diferentes actividades biológicas halladas para algunos de los flavonoides (antimicrobiana, antimicótica, etc.) y las evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales (es decir que actúan como fitoalexinas), sugieren que estas sustancias también son un mecanismo químico de defensa vegetal.

- La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal.

Según estudios de Johannot y Somerset (2006), los flavonoides generaron mejores expectativas al control del cáncer y la patología cardiovascular. Los flavonoides son compuestos importantes para mantener los conductos sanguíneos saludables, por la regulación de la permeabilidad capilar y permitir el flujo de oxígeno, dióxido de carbono y otros nutrientes.<sup>72</sup>

Muchos flavonoides aumentan la resistencia de los capilares previniendo que estos se tornen flácidos, probablemente en combinación con la vitamina C. Los flavonoides previenen la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) previniendo la formación de placa aterosclerótica. También pueden prevenir la excesiva acumulación de plaquetas, previniendo la coagulación sanguínea y el daño a los capilares, según estudios de Mojzisova y Kuchta (2001)<sup>73</sup>.

Los flavonoides poseen un efecto vascular positivo, por ejemplo las células endoteliales vasculares mantienen la salud cardiovascular por la producción de óxido nítrico (NO) un poderoso vasodilatador. Los flavonoides poseen el mismo efecto vasodilatador, cuyo mecanismo de reacción para estar relacionado a la inhibición de la proteína C-quinasa.<sup>52</sup>

Los flavonoides tienen un papel en la prevención de aterosclerosis por dos mecanismos: protegen la oxidación de LDL demorando la peroxidación lipídica y también incrementan la resistencia celular a los efectos nocivos de la molécula LDL oxidada, de acuerdo a estudios de Luis y Aller (2008)<sup>74</sup>

Otro mecanismo a este nivel, es que el grupo flavonoles, inhibe la agregación de plaquetas atrapando a los radicales libre de forma directa,

también por mantenimiento adecuado de la concentración de prostaglandinas endoteliales y óxido nítrico, citado por Nijveldt et al (2001).<sup>75</sup>

Estudios de Freedman et al (2001), determinaron el efecto de jugo de uva roja y los flavonoides principales en la función plaquetaria y la producción de NO. Ellos observaron que la incubación de plaquetas con jugo de uva diluida inhibió la agregación, incremento la producción de NO y disminuyó la producción de su peróxido.<sup>76</sup>

Por sus potentes efectos antioxidantes, los flavonoides son una importante familia de drogas flebotrópicas. Sus propiedades en la protección de venas se comprobó en el tratamiento de insuficiencia venosa. El Laboratorio francés Servier Laboratories produjo el Daflon 500 mg que está compuesta por una mezcla de diosmina y hesperidina (90% + 10%) respectivamente, flavonoides que en la actualidad se han tornado en medicamentos preferidos para el tratamiento de deficiencia venosa crónica.

En cuanto a patologías virales, se encontró que una fracción de Flavonoide conocida como catequina inhibió la activación del Virus de Epstein Barr y que se debió a una molécula en particular, el grupo 3-OH de la estructura catequina sintética empleada en la investigación de Nagakawa et al (2005)<sup>77</sup>

### **Vitaminas E, C y B-caroteno**

La vitamina E es un antioxidante natural que reacciona con los radicales libres solubles en lípidos de la membrana celular. Se conoce que cada molécula de Vitamina E es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos. Actúa en asociación con otros sistemas antioxidantes: CAT, SOD. Su mecanismo de reacción es capturar radicales hidroxilo y aniones superóxido y neutraliza el peróxido de hidrógeno.

La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble que figura en primera línea de defensa del plasma. Es un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos, coadyuva en la regeneración de Vitamina E. Reacciona fácilmente con radicales libres actuando como antioxidante y pasando a convertirse en radical ascorbilo que se descompone rápidamente para producir ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico. Su mecanismo de reacción es la captura de radicales hidroxilo y aniones superóxido y neutralizando el oxígeno singlete. Esta vitamina es un poderoso reductor en su forma de ácido ascórbico y la dehidroascórbico es su forma oxidada. Su interconversión está dada por la glutatión deshidrogenasa y la ascorbato deshidrogenasa. La Vitamina C tiene como función importante donar uno o dos electrones, esto le permite ser una gran sustancia antioxidante, sin embargo es muy lábil a la temperatura. Existen muchos métodos para su cuantificación, desde los cromatográficos, espectrofotométricos y biológicos.

Los carotenos, pigmento más abundante de la naturaleza, se transforman en vitamina A al ingerirse. Elimina los radicales libres y protege al ADN de su acción mutagénica. Todos los pigmentos vegetales de coloración amarillanaranja son del grupo carotenoide con actividad antioxidante, su mecanismo de reacción es neutralizar el oxígeno singlete. Se clasifican en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas.

Además de ser precursor de la vitamina A, la propiedad antioxidante como sustancia liposoluble citada por Britton (1995) y Krinsky (1988), hacen de este una vitamina funcional, citados por Hurst (2002). Su estructura carbonada central con dobles enlaces es responsable de la naturaleza antioxidante.<sup>78</sup> Los factores que le dan la función antioxidante son: presencia de grupos funcionales oxigenados en su estructura (Terao, 1989), las condiciones del medio donde actúa el pigmento (Liebler, 1993; Martin et al., 1999), y la naturaleza como

sustancia pro oxidante (Everett et al., 1996). Muchos de estos factores pueden causar un efecto de oxidación propia en lugar del efecto beneficioso antioxidante. Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* concluyeron que la acción antioxidante de pigmentos como caroteno y licopeno es realmente efectiva. Su acción antioxidante protege contra ciertos cánceres y tumores relacionado con la aparición de radicales libres (sustancias pro oxidantes). Al interceptar estas sustancias nocivas, los carotenoides llegan a ser quimioprotectores o anti cancerígenos. Muchos estudios epidemiológicos muestran la relación positiva entre consumo de licopeno de la dieta y la baja probabilidad de aparición de próstata de cáncer (Gann et al., 1999; Johnson, 2000; Stahl and Sies, 1996), mencionados por Hurst, 2002<sup>78</sup>

## **Oligoelementos**

Los oligoelementos son: cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio. Estos forman parte del núcleo activo de muchos antioxidantes. Por ejemplo Superóxido dismutasa o SOD requiere Zn, Mn y Cu para eliminar radicales hidroxilo. La glutatiónperoxidasa ó GSH-Px tiene como parte del núcleo activo al Selenio. La catalasa ó CAT posee al Fe como elemento del núcleo activo

### **➤ Selenio**

En la naturaleza, el selenio se encuentra ampliamente distribuido en forma de seleniuro combinado con elementos pesados y en menor proporción como elemento libre asociado con azufre elemental e hidrógeno. Su disminución o aumento de concentración puede provocar deficiencias o efectos tóxicos en el humano.

El selenio es uno de los elementos con actividad muy importante en el sistema enzimático de enzimas como la glutatión peroxidasa. Los efectos

beneficiosos del selenio siempre están relacionados con el contenido de selenoproteínas o enzimas dependientes de selenio en el organismo. En la estructura de la selenoproteína, tiene uno o varios átomos de selenio que reemplaza el azufre de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina, dando lugar a especies orgánicas de selenio como selenocistina (SeCys<sub>2</sub>), selenocisteína (SeCys), selenometionina (SeMet), metil-selenocisteína (CH<sub>3</sub>SeCys) y seleno-metil-selenocisteína (SCM).<sup>79</sup>

El selenio constituye un elemento apreciado por su actividad antioxidante, presente en cantidades significativas en los alimentos. En la actualidad estas especies son el objetivo de numerosas investigaciones en el campo de la salud humana, por las propiedades antioxidantes y anticancerígenas.<sup>80</sup>

El requerimiento nutricional para selenio establecido por la RDA, Recommended Dietary Allowance, para un adulto es 0.05 -0.07 mg/día, donde valores mayores a 0.4 mg/día pueden ocasionar síntomas de toxicidad, de acuerdo a revisión de Dugo et al, 2003.<sup>81</sup>

### **1.3.9. Capacidad antioxidante de los granos de cañihua**

Estudios preliminares de Peñarrieta et al (2005), donde empleó ocho alimentos andinos para conocer su capacidad antioxidante total (TAC), clasificó como los de TAC alto (en comparación con otros cereales) a los obtenidos en cañihua, en las fracciones acuosa y no acuosa de sus extractos ( extracto acuoso 7,8  $\mu\text{mol/g}$  de materia seca y en extracto insoluble 5,9  $\mu\text{mol/g}$  en muestra seca por el método de FRAP), en tanto que los de TAC intermedio fueron: oca tarwi y quinua, finalmente los con TAC bajo: papa, arracacha, ulluco y amaranto.<sup>15</sup>

Estudios posteriores sobre el tema, han corroborado que *Chenopodium pallidicaule*, posee una elevada capacidad antioxidante, por lo tanto la señalan como una potencial fuente de sustancias naturales antioxidantes medida mediante pruebas como ABTS, FRAP. Los compuestos responsables para esta actividad fueron identificados por técnicas de HPLC, donde los granos de cañihua mostraron presencia de ocho compuestos identificados como catequina galatos, catequina, ácido vainílico, kaemferol, ácido ferúlico, quercetina, resorcinol y 4-metilresorcinol. Estos compuestos son los responsables de la Capacidad Antioxidante Total que exhibe este grano.

Como ya se citó Rastrelli, dilucidó 2 estructuras nuevas de flavonoides: isoramnetina 3-O- $\beta$ -D-apiofuranosil (1 2)-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 6)-  $\beta$  -D-glucopiranosido y quercetina 3-O-  $\beta$  -D-apiofuranosil (1 2)-O-  $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 6) $\beta$ -D-galactopiranosido.

La presencia de estos compuestos específicos explica la capacidad antioxidante biológica que posee. Esta es una razón de que estos metabolitos no se limitan a nivel biológico, sino que es posible emplearlos en la industria alimentaria con el fin de elevar el tiempo de vida de los alimentos.

Los grupos flavonoides encontrados poseen actividad antioxidante y por tanto pueden sustituir tranquilamente antioxidantes sintéticos con efectos tóxicos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT). Este estudio de los antioxidantes naturales en la industria alimentaria como ingredientes agregados aumentan el tiempo de vida de los productos, porque prevendrían pérdida de su calidad sensorial y nutricional y mejorarían la estabilidad de los lípidos, vitaminas y flavor de los alimentos citadas por varias investigaciones (Rastrelli, 1995) <sup>12</sup>

La determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cañihua en muestras de otras regiones latinoamericanas (peruanas), corroboran más aun que los compuestos fenólicos son responsables de la capacidad antioxidante. Y frente a granos como quinua y kiwicha, muestran a la cañihua como un grano intermedio en esta capacidad. (Repo-Carrasco et al, 2008) <sup>10</sup>

### **1.3.10. Química de los Indicadores Foto colorimétricos**

#### **▪ Técnica ABTS/TEAC**

En el ensayo ABTS/TEAC se mide la capacidad antioxidante total (TAC) en equivalentes de Trolox®. Fue reportado por primera vez por Miller y Rice-Evans en 1993 <sup>82</sup>. El ensayo se basa en la capacidad de captura que tiene el anión radical ABTS•<sup>+</sup> [ácido 2,2 '- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] de vida larga, que se observa por la coloración que desarrolla, midiéndose la desaparición del catión, o color en un espectrofotómetro en el rango visible a 734 nm.

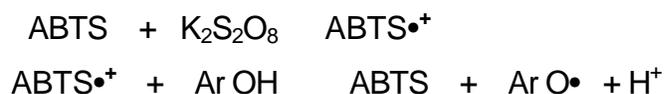
Miller y otros describieron un ensayo modificado capaz de medir la actividad antioxidante de carotenoides (1996), empleando dióxido de manganeso para oxidar el ABTS. Un acercamiento similar fue descrito por Re et al<sup>24</sup> donde el ABTS fue oxidado por persulfato de potasio, esta versión del ensayo es aplicado a fracciones soluble de agua y a su vez en fracciones lipofílicas antioxidantes (Pellegrini et al mencionado por Arts et al).<sup>83</sup>

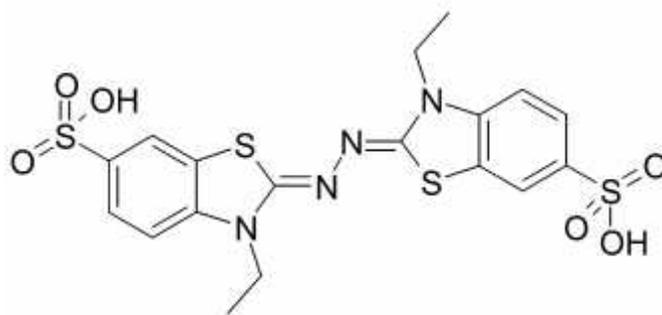
Con el afán de mejorar el método se emplearon diferentes sustratos oxidantes de la molécula ABTS, tenemos a Arnao et al (1996, 1999, 2001), Cano et al (1998), Campos y Lissi (1996), Schlesier et al (2002) y De Beer et al (2003). Finalmente Kim et al (2002) sugirieron que en lugar de Trolox podía emplearse ácido ascórbico, autores citados por De la Rosa.<sup>52</sup>

Este ensayo con algunas modificaciones realizadas, actualmente es ampliamente empleado en muchos estudios relacionados a la determinación *in vitro* de actividad antioxidante de frutas y vegetales porque tiene la ventaja de ser rápido, simple en su desarrollo, tornándolo accesible. También los ensayos de ABTS se aplican en una variedad de jugos, incluyendo manzanas, naranjas, grosella negra, uvas, ciruelas, cebollas, tomate, berenjena, alcachofa, espinaca, lechuga, espárragos y brócoli.<sup>52</sup>

El ensayo mide la capacidad de un compuesto antioxidante de secuestrar el radical ABTS•, relativamente estable de color azul/verde que se convierte en un producto incoloro. El grado de la decoloración refleja la concentración de ABTS• que fue secuestrado y puede ser determinado espectrofotométricamente. El valor de TAC se asigna por comparación de la capacidad de secuestro de un antioxidante estándar que es el Trolox, sustancia estructuralmente análoga a la vitamina E pero soluble en agua (químicamente es el compuesto 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Estructuralmente los compuestos catecol, resorcinol e hidroquinona poseen el TAC más alto cuando se realiza el ensayo.

La inhibición de absorbancia por los antioxidantes del radical catión ABTS•+ es el principio de este método cuyo pico característico de absorción muestra un máximo a 660, 734 y 820 nm. La reacción en la que se basa ABTS puede resumirse como sigue:





**Figura 22.** Estructura química del ABTS•+. Fuente: www.Chemical Book.

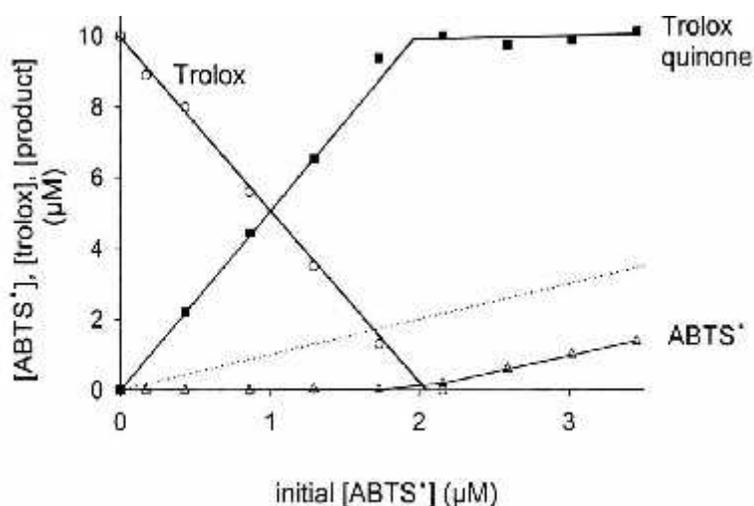
La reacción del catión ABTS es más reactiva que la del radical DPPH, ya que se sucede en el minuto de reacción, de acuerdo a Pokorny et al, 2001.<sup>45</sup>

De acuerdo a las investigaciones realizadas, se conoce que los productos de la reacción de esta prueba contribuyen al valor de TAC aparte del compuesto inicial. Una diferencia de reactividad de los productos de reacción causa diferencias en los valores de TAC. Esto significa que un valor de TAC mide la suma total de todas las reacciones de secuestro de radicales fueran cuales fueran, éstos además del efecto del compuesto principal, aunque no se debe dejar de considerar que por las interacciones en el conjunto de reacciones podría existir alguno que se enmascare.

Por otro lado se ha considerado que una limitante de esta reacción es el rango de concentración de la sustancia antioxidante, encontrándose que concentraciones entre 2.5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  otorgan resultados exactos en la determinación de TAC. Se observó también que los flavonoides presentan una interacción con las proteínas, afectando ésta reacción a la capacidad antioxidante total, sin embargo no totalmente.<sup>83</sup>

En un análisis por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), la reacción combinada de ABTS• y Trolox mostró el incremento de la concentración de ABTS de forma paralela a la disminución de la concentración

de Trolox. La estequiometría de la reacción de estos dos compuestos es 1.9, donde el Trolox pasa a una forma de trolox quinona, este producto no reacciona con  $ABTS^\bullet$ . Esta reacción es posterior a una adición de la variable concentración inicial de solución de  $ABTS^\bullet$  a una solución de trolox 10  $\mu M$ . La mezcla fue analizada con posterioridad a los 6 minutos, la línea punteada representa la concentración de  $ABTS^\bullet$  cuando no se añadió Trolox a la mezcla de reacción. Esta explicación fue dada por la investigación de Pokorny et al, 2001, presentada en la figura 23. <sup>45</sup>



**Figura 23.** La concentración de trolox,  $ABTS^\bullet$  y la quinona formada. Fuente: Pokorny, 2001.

#### ▪ Técnica DPPH

Esta prueba mide la captura de radicales libres. Fue propuesta e introducida por Marsden Blois y publicada en el Journal Nature como un ensayo corto, pero completo. Una variante es la de Sánchez-Larrauri-Saura-Calixto que emplea metanol para la solución de DPPH.<sup>84</sup>

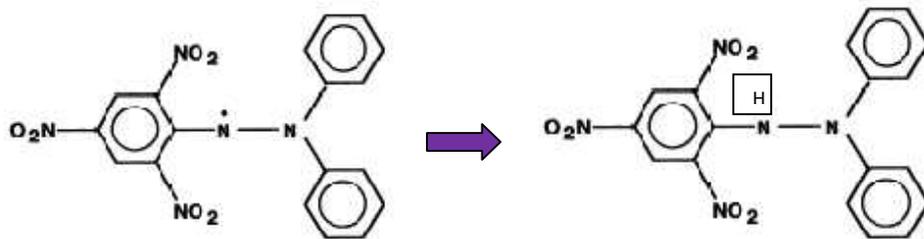
Se basa en el secuestro del radical por parte de los antioxidantes. El radical libre DPPH $\bullet$  es reducido a hidracina cuando reacciona con un donador de

hidrogeno. La habilidad que se evalúa se basa en que el radical DPPH• está inversamente relacionado a la concentración del antioxidante en el momento de la reacción. La decoloración disminuye en un rango de 515 a 528 nm producido por la adición del antioxidante a la solución metanólica o etanólica de DPPH.

Una reacción rápida de los radicales de DPPH ocurre con algunos fenoles por ejemplo: -tocoferol, sin embargo a veces se presentan reacciones secundarias lentas que pueden causar una disminución progresiva en la absorbancia, que demorará hasta varias horas. Por esta razón se emplea un tiempo de reacción de 15 a 30 minutos. Para evitar este punto, comúnmente se reporta como EC<sub>50</sub> que es la concentración de antioxidante requerido para el secuestro o inhibición del 50% de radicales DPPH en un período de tiempo determinado.<sup>85</sup>

Según trabajos de Sánchez-Moreno este ensayo es fácil y muy certero para la determinación de capacidad antioxidante en frutas y vegetales, en especial la reacción de polifenoles.<sup>84</sup>

La reacción química observada en la prueba es: el radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil, DPPH, uno de los pocos radicales orgánicos de nitrógeno estables, sufre la deslocalización del electrón solitario de la molécula en conjunto, de modo que la molécula no se dimeriza, como ocurre con la mayoría de los radicales libres. La deslocalización da lugar a un color violeta profundo, cuya banda de absorción en solución etanólica está centrada en torno a 515-520 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, el DPPH se reduce perdiendo el color violeta. La molécula de DPPH es la siguiente:



**Figura 24.** Radical libre y forma no radical de DPPH. Fuente: Molineux, P (2004) <sup>86</sup>

La siguiente reacción muestra la relación que se presenta en un sistema de oxidación, como la auto oxidación de un lípido u otra sustancia insaturada, la molécula de DPPH es suprimida por una sustancia (AH) cambiando de color por la reducción de la molécula DPPH, la reacción primaria es:



Este método posee un procedimiento relativamente sencillo, considerando algunos cuidados como el manejo de la solución de trabajo, tiempo de conservación, ausencia de humedad y cantidad de luz.<sup>85</sup>

Dado que se desconoce la matriz (componentes) de los diferentes extractos, es erróneo generalizar condiciones universales para todos los ensayos de actividad Antioxidante a partir de un solo ensayo, por tanto es importante la utilización de diferentes sustancias y extractos vegetales para brindar flexibilidad y adaptabilidad a las condiciones propuestas.

Las reacciones llevadas a cabo con el radical libre DPPH muestran no ser termalmente estables, por tanto se deben realizar a temperatura baja, evitando las variaciones térmicas de magnitud considerable de acuerdo al estudio de Blois<sup>85</sup>

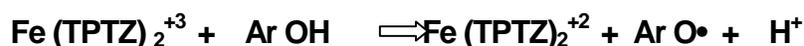
El tiempo de reacción establecido para el análisis de actividad antioxidante en extractos vegetales corresponde a 16-20 minutos; debe tenerse en cuenta que este, en el caso de la evaluación a compuestos puros, constituye un parámetro característico relacionado con la naturaleza química de cada compuesto.<sup>86</sup>

#### ▪ **Técnica FRAP o Poder Antioxidante Reductor Férrico**

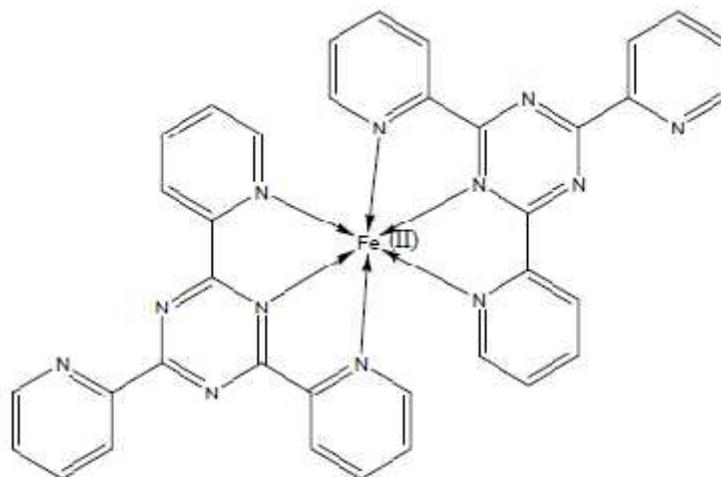
Este ensayo fue descrito primero en 1996 por Benzie y Strain. La técnica FRAP se basa en la habilidad de los fenólicos de reducir un análogo de la ferroína, el complejo  $\text{Fe}^{+3}$  con la tripiridiltriazina  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{+3}$ , a un complejo  $\text{Fe}^{+2}$  con la  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{+2}$ , de color intensamente azul en condiciones de medio ácido (pH 3.6) En contraste con muchos otros sistemas de prueba, no usa ningún radical.<sup>87</sup>

El método FRAP es una técnica espectrofotométrica simple, barata y robusta. Sin embargo, la relevancia de este ensayo es incierta, porque la reacción del ensayo ocurre por transferencia electrónica que no imita situaciones fisiológicas. El ensayo no es muy sensible a antioxidantes tipo tiol como glutatión. Este ensayo, FRAP se aplicó originalmente al plasma pero se ha usado para evaluar la actividad antioxidante de extractos de diferentes plantas y jugos de fruta con buenos resultados.<sup>88, 89</sup>

Los antioxidantes detectados por FRAP se limitan a los solubles en agua (o sea, solubles en soluciones acuosas y etanólicas. Las reacciones observadas son:



La estructura del complejo formado es la siguiente:



**Figura 25.** FRAP. Fe (II) (TPTZ)<sub>2</sub>. Cation ferroso tripiridiltriazina. Fuente: Wikipedia

#### ▪ **Determinación por Folin-Ciocalteu**

El ensayo de Folin-Ciocalteu (EFC) es una de las técnicas más antiguas diseñadas para determinar el contenido total de compuestos fenólicos. Originalmente este ensayo intentaba analizar proteínas, aprovechando el grupo fenol en la tirosina <sup>90</sup>. Después, Singleton y Rossi, (1965) extendieron este ensayo a la medición de fenoles totales en el vino <sup>91</sup>. En este ensayo, la oxidación de los fenólicos por un reactivo molibdowolfrámico da un producto coloreado con una absorbancia cercana a 750 nm, originado por óxidos azules de wolframio (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) y molibdeno (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>).

Sin embargo, esta técnica no es recomendable para productos con alto contenido de vitamina C, muchos compuestos no fenólicos tales como el ácido L-ascórbico, reducen los azúcares, y las proteínas solubles (Prior et al. 2005). A pesar de la naturaleza química indefinida del reactivo de F-C, este método es simple, reproducible y conveniente, por consiguiente ha sido y es usado

ampliamente al estudiar los antioxidante fenólicos. Algunas aplicaciones son verduras, frutas, nueces y frutos secos.<sup>92</sup>

El contenido de fenólicos totales se mide empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C), adaptado del método de Spanos y Wrolstad.<sup>93</sup> Este ensayo está basado en la reacción de color de los fenoles con el reactivo del ácido fosfomolibdico-fosfowolfrámico el que se compara con el control o curva estándar de ácido gálico. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a la longitud de onda 765 nm. Los fenólicos totales determinados por el ensayo de F-C con mayor frecuencia son expresados como equivalentes de ácido gálico. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos o también como  $\mu\text{Mol}$  de ácido gálico por gramo de muestra seca.

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido durante muchos años utilizado como medio para determinar fenólicos totales en los productos naturales.<sup>94</sup> La reacción que tiene lugar es una de oxidación y otra de reducción. F-C también puede considerarse un método de capacidad antioxidante. Este ensayo tiene muchas variaciones



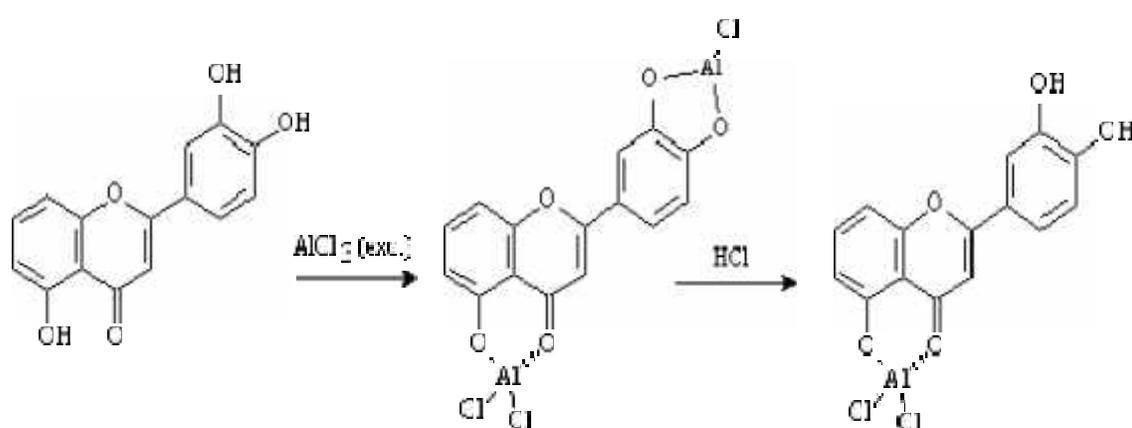
#### ▪ **Determinación de Flavonoides Totales**

Las reacciones de identificación de flavonoides, se basaron inicialmente en ensayos cualitativos para su determinación: Ensayo de Shinoda, Ensayo con Zn/HCl, Ensayo de Pacheco, Reconocimiento de Antocianinas y la Espectroscopia Ultravioleta-Visible, Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas, Difractometría de Rayos-X.

De acuerdo a la Espectroscopia Ultravioleta-Visible los espectros UV de los diferentes flavonoides presentan bandas características por los sistemas

conjugados de los anillos aromáticos. La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula se establecen por el comportamiento del espectro UV al añadido de reactivos de desplazamiento como Metóxido de sodio, Acetato de sodio, Cloruro de Aluminio, etc.

El Cloruro de Aluminio anhidro forma quelatos con flavonoides orto-hidroxilados, 3-hidroxilados y 5-hidroxilados, presentados en figura 26.



**Figura 26.** Complejo coloreado flavonoide-aluminio. Fuente: Wikipedia

En el caso de los o-dihidroxilados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxilados son estables. Los flavonoides totales se determinan por el método descrito por Zhishen et al. <sup>95</sup>

Este ensayo se basa en la reacción de color de los flavonoides que se produce al mezclar las muestras con  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{NaNO}_2$  en la que se forma un complejo coloreado flavonoide-aluminio. La absorbancia de una muestra a 510 nm se compara con el control y con una curva estándar de catequina.

#### 1.4. JUSTIFICACIÓN

Muchas entidades como la ONU, FAO, comisiones como CEPAL y programas como PMA (Programa Mundial de Alimentos de las Naciones Unidas) durante la última década han descrito el incremento en los niveles de hambre y desnutrición en América Latina y el Caribe y señalan que el grupo más vulnerable es el de la niñez. En informes presentados en foros se indica especialmente al Ecuador, Perú, Bolivia y Colombia.<sup>96-99</sup>

En resultados obtenidos por las Naciones Unidas sobre el Derecho a La alimentación, la desnutrición crónica afecta a uno de cada cuatro niños en Bolivia, los bolivianos que viven en situación de pobreza alcanzan el 60% de la población, indicándose que un 40% lo hace en condiciones "de tan extrema pobreza que no puede permitirse alimentar a sus familias". Esto se corrobora por datos oficiales del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2009), muestran que en el último quinquenio un total aproximado de casi 76 mil niños y niñas perecieron antes de cumplir los cinco años de vida, confirmando que Bolivia es uno de los países que registra los mayores índices de mortandad de menores, resultando paradójico ya que la producción agrícola de nuestro país no podría envidiar a ningún país por la calidad y cantidad de alimentos.<sup>100, 101</sup>

Por otro lado, cada año más de 200 millones de toneladas de contaminantes peligrosos son descargados en la atmósfera. Con cada respiración se exponen a los pulmones y al organismo a una gran cantidad de sustancias tóxicas. Hay un número cada vez mayor de enfermedades que se relacionan con los radicales libres liberados al medio ambiente sin control alguno.

Mientras que en un sector de la población mundial se observa déficit alimentario por una economía pobre, de forma paradójica se observa que el

consumo de grasas, azúcares y alimentos refinados, procesados y enlatados es cada vez mayor en la población con mayores recursos económicos. El consumo de alimentos frescos es cada vez menor. Por lo tanto se observa un desbalance en la homeostasis de acción oxidante externa y la respuesta antioxidante de los seres vivos, mostrando el efecto de ésta causa en la desregulación del crecimiento celular, inactivación de los mecanismos de defensas inmunológicas y la pérdida o disminución de los procesos de traducción de señales entre diversos sistemas biológicos.

Por esto un adecuado nivel de antioxidantes en la dieta es vital, porque son sustancias que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato, evitando a las enfermedades asociadas a los ataques de radicales libres como aterosclerosis, diabetes mellitus, envejecimiento, cáncer, enfermedades respiratorias, Enfermedad de Alzheimer, hepatopatías, artritis reumatoide, SIDA, enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, etc.<sup>102</sup>

La población actual en crecimiento acelerado, especialmente en países emergentes (o en vías de desarrollo) requiere de forma urgente la generación de nuevas fuentes nutricionales y para ello se pretende ofrecer un alimento completo nutricionalmente que además puedan contribuir al control de algunas enfermedades por la presencia de sustancias antioxidantes naturales. Por esto, se ha visto resurgir la tendencia de incentivar el cultivo de especies olvidadas y subutilizadas dentro de la agricultura, la que permite identificar y desarrollar nuevos cultivos para mercados domésticos y para exportación. Muchos foros internacionales apoyan y emprenden actividades para mejorar el manejo de los recursos fitogenéticos a nivel mundial, para erradicar la pobreza, incrementar la seguridad alimentaria y proteger el medio ambiente.

También se trabajan a nivel de mejora de los cultivos y producción de vegetales, según estudios realizados, los métodos para cultivos orgánicos pueden incrementar las concentraciones de antioxidantes en vegetales, frutas y granos, elevando así su capacidad antioxidante sin elevar la proporción de calorías.<sup>103</sup>

Actualmente el trabajo de recuperación de cultivos de especies potenciales recibió mayor atención, donde expertos trabajan en estrecha colaboración con miembros de la comunidad. Es así que entidades como PROINPA, banco de germoplasma que incluye los granos andinos y cañihua van promoviendo un mejor trabajo con nuestros granos y a la vez mejora de la situación económica de la población productora.

Por lo tanto, impulsar la producción orgánica de cañihua para la exportación y fortalecer la producción tradicional para el autoconsumo y para el mercado regional, promover programas cooperativos a nivel regional sobre los granos andinos con participación estrecha de los actores de la cadena productiva, desarrollar tecnologías de producción orgánica para los granos andinos y revalorar los granos andinos hasta ahora poco utilizados como la cañihua, será logro importante del presente estudio.

Desarrollar normas de calidad para la exportación de granos andinos, promocionar los productos andinos con certificado de origen e identidad cultural andina. Estudiar los usos alternativos y subproductos de los granos andinos (adornos, colorantes, medicamentos, etc.) y promover el valor agregado en los países productores son otros logros que justifican el presente trabajo.

## 1.5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Del universo de estudio conformado por 31 muestras de granos de cañihua reunidas de diferentes sitios geográficos del altiplano y valle de nuestro país, con diferencias distintivas en el color de grano, además de aquellas otorgadas por el Banco de Germoplasma PROINPA La Paz: ¿ se podrá en el conjunto de muestras y accesiones de *Chenopodium pallidicaule* sp procesadas en el presente trabajo encontrar un rango de valores de Capacidad Antioxidante Total que en relación a valores consignados en la literatura de vegetales semejantes a éste, reporte datos que valoricen a este cultivo por su TAC y permitan en el futuro establecer reclamaciones fundamentadas de salud?

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Determinar la capacidad antioxidante total de granos y alimentos de diferentes variedades de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), muestreados en la región andina de Bolivia.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la Capacidad Antioxidante Total de los granos de cañihua de acuerdo a los ensayos FRAP, ABTS y DPPH empleando Espectrofotometría UV-Visible.
- Cuantificar la concentración de fenoles totales por el Método Folin-Ciocalteu.
- Cuantificar la concentración de flavonoides totales por el Método de Zhishen.
- Determinar la existencia de asociación entre el color de los granos de cañihua y la Capacidad Antioxidante Total
- Analizar la correlación de los datos de Capacidad Antioxidante Total obtenidos por los distintos ensayos, que se diferencian en los mecanismos de reacción química.

### **III. DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **3.1. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Tipo de estudio, ejecución de un diseño experimental, completamente al azar.

#### **3.2. MATERIALES**

##### **3.2.1. Muestra**

Nuestro universo muestral está constituido por dos fuentes:

a) Las muestras que nos fueron otorgadas por la ONG PROINPA (Promoción e Investigación de Productos Andinos), que para la diversificación y mejoramiento de las semillas andinas cuenta con un Banco de Germoplasma, laboratorios y terrenos de cultivo donde por procedimientos de fitomejoramiento obtienen variedades más promisorias de semillas, empleando técnicas de cruzado de semillas más resistentes con otras de mejor valor nutricional a las que se denominan accesiones. Este es el tipo de muestras que sirvieron de base para la formulación inicial del proyecto, dos de las cuales poseen datos de análisis proximal por lo que son 2 variedades nuevas de cañihua, denominadas: Kullaca e Illimani y 16 accesiones (futuras variedades).

b) Las muestras obtenidas en varias salidas de campo: 10 especies silvestres y

c) Muestras de alimentos: 1 muestra de harina (pito) de cañihua y 2 granolas en base de cañihua. Un total de 31 muestras que conforman el universo para éste proyecto de tesis.

La tabla 5, presenta: código de muestra, lugar de origen, punto geográfico y propiedad de cada grano analizado en el presente trabajo.

**Tabla 5.** Relación de muestras y su lugar de origen.

Código	Lugar	Altura msnm	Longitud (19L)	Latitud (UTM)	Variedad	Propietario
V-1	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Kullaca	PROINPA
V-2	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Illimani	PROINPA
A-088	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-137	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-151	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-155	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-166	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-173	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-187	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-197	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-222	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-300	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-399	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-475	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-568	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-616	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-636	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
A-771	Patacamaya	3808	0613218	8092642	Accesión	PROINPA
GPK-2	Kallutaca	-	-	-	Silvestre	Muestreo CEIQA 2008
GPB-3	Belén	-	-	-	Silvestre	Muestreo CEIQA 2008
GNS-4	Taraco	-	-	-	Silvestre	Muestreo CEIQA 2008
DK1	Challapata1	3718	19K 0733615	7910620	Silvestre	Muestreo CEIQA 05/2009
DK2	Challapata 2	3718	19K 0733615	7910620	Silvestre	Muestreo CEIQA 05/2009
KO-1	Challapata 3	3718	19K 0733615	7910620	Silvestre	Muestreo CEIQA 05/2009
C-UM	Umala				Silvestre	Muestreo CEIQA 05/2010
C-OR	Oruro				Silvestre	Muestreo CEIQA 06/2010
C-PO	Potosí	1737			Silvestre	Muestreo CEIQA 06/2010
GNAR	Independencia	-	-	-	Silvestre	Muestreo CEIQA 2008
P-1	Puesto Callejero	-	-	-	Comercial	Muestreo CEIQA 2011
G-1	Producto envasado	-	-	-	Pop de cañihua/miel de caña	Muestreo tesis
G-2	Producto envasado	-	-	-	Granola de cañihua, amaranto, quinua, miel de caña	Muestreo tesis

Fuente: Elaboración propia

Se cuenta con un Banco propio de fotografías de todos los granos tomando en cuenta las características de los granos descritos en la tabla 6.

Tabla 6. Presentación de los granos de *Chenopodium pallidicaule*

			
<b>1. Illimani</b>	<b>2. Kullaca</b>	<b>3. A-088</b>	<b>A-137</b>
			
<b>A- 151</b>	<b>A- 155</b>	<b>A-166</b>	<b>A-173</b>
			
<b>A-187</b>	<b>A-197</b>	<b>A-222</b>	<b>A-300</b>
			
<b>A-399</b>	<b>A-475</b>	<b>A-568</b>	<b>A-616</b>
			
<b>A-636</b>	<b>A-475</b>	<b>Silvestre</b>	<b>Silvestre</b>
			
<b>Pito</b>	<b>Producto</b>	<b>Producto</b>	

Cada muestra presenta una característica distinta de color, desde los marrones, rojizos, naranja, beige, etc. Sin embargo el tamaño de la mayoría va desde 0.5 hasta 1 mm de diámetro.

Las accesiones empleadas son producidas por PROINPA en diversos sitios del altiplano boliviano. En la figura siguiente se muestra el cultivo de una de las accesiones en estudio.



**Figura 27.** Producción de cañihua en la Accesión 300 en comunidad San Pedro y San Pablo, La Paz. Fuente: PROINPA, 2010.

### 3.2.2. Reactivos Químicos

**Tabla 7.** Relación de Reactivos, estructura, laboratorio y procedencia

REACTIVO	ESTRUCTURA	LABORATORIO	PROCEDENCIA
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)	Sigma Aldrich	Germany
Acetato de sodio	CH <sub>3</sub> COONa	Panreac	España
Acetona	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	USA
Acido acético	CH <sub>3</sub> COOH	Merck	Alemania
Acido clorhídrico	H Cl	Sigma, Aldrich	USA
Acido gálico		Sigma, Aldrich	USA
Alcohol etílico	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Winkler	México
Alcohol etílico absoluto	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Técnico	
Carbonato de sodio	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	BDH	
Catequinas		Sigma, Aldrich	
Cloruro de hierro	Fe Cl <sub>3</sub> 6 H <sub>2</sub> O	Sigma, Aldrich	
Cloruro de aluminio hexa hidrato	Al Cl <sub>3</sub> 6 H <sub>2</sub> O	Sigma, Aldrich	USA
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil	Sigma, Aldrich	USA
Folin Ciocalteu		Sigma, Aldrich	USA
Hidróxido de sodio	NaOH	Sigma, Aldrich	USA
Nitrito de sodio	NaNO <sub>2</sub>	Sigma, Aldrich	USA
Persulfato de potasio	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico	Sigma, Aldrich	USA
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s- triazina	Sigma, Aldrich SA	USA

### 3.2.3. Equipos e Instrumentos

**Tabla 8.** Relación de Materiales, marca, procedencia empleados.

MATERIAL	MARCA	PROCEDENCIA
Agitador eléctrico Vortex	Thermoline, tipo 37600 Mixer	Bolivia
Agitador magnético	Magnetic Stirrer HI 190 M Hanna Inst	
Balanza analítica	Precisa 125 A Swiss Quality	
Cámara de refrigeración	FrioLux	
Centrífuga	Heraeus Sepatech Suprafuge 22	Alemania
Espectrofotómetro UV/Vis	Perkin, Elmer, modelo LS50B	
Estufa		
Freezer medical	Sanyo, modelo MDF-U332, N° 606033941	
pH metro Microprocesador	pH 537 WTW	Alemania
Refrigerador Mademsa	Evolution 3500 G no frost system	
Sonicador		

### 3.2.4. Insumos y Utensilios

**Tabla 9.** Relación de Material de vidrio, plásticos empleados.

MATERIAL DE VIDRIO, PLASTICO	DETALLE	MATERIAL DE VIDRIO, PLASTICO	DETALLE
Cubetas de plástico	1 mL	Licuadaora	2 equipos
Fuentes plásticas	5 unidades	Material de vidrio	Lo necesario
Gradillas	48 tubos	Mortero	Porcelana
Guantes	Látex	Parafilm	Lo necesario
Micropipetas	100 µL, 200, 1000 µL	Típs	100 µL y 1000 µL
Tubos plásticos	Lo necesario	Tubos de hemólisis	Vidrio

### 3.3. Obtención de extracto y Protocolo de los ensayos

#### 3.3.1. Obtención del extracto

La extracción de la fracción antioxidante empleó el solvente metanol directamente sobre los granos de cañihua. Este método se fundamenta en otra investigación realizada donde la eficacia observada de éste solvente fue mayor a otras combinaciones de solventes empleado.<sup>104</sup> La metodología de extracción emplea granos molidos y metanol sometidos a homogenización para posteriormente llevar a sonicación. Finalmente se centrifuga y separa el sobrenadante que será preservado a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento del análisis.



**Figura 28.** Tubos con extracto metanólico de muestras silvestres.

Fuente: Propio de la tesis

### 3.3.2. Protocolo de las Técnicas empleadas

- **Ensayo ABTS**

Este ensayo emplea una solución acuosa de 2,2-azinobis (etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) (7 mM) oxidada con persulfato de potasio 2,45mM. La solución de ABTS se diluye con solución tampón fosfato salino de pH=7.4 hasta una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. La curva de calibración del estándar se construye con trolox a diferentes concentraciones. Una alícuota de cada muestra se mezcla con 1 mL de la solución del radical catión ABTS en un tubo, para luego leer su absorbancia.

Las concentraciones fueron calculadas de acuerdo a las absorbancias obtenidas, empleando para ello la fórmula de % de inhibición inicialmente y la fórmula para la determinación de Capacidad Antioxidante Total (TAC)

$$(1) \% \text{ Inhibición} = (A - A_1/A) \times 100\%$$

Donde:

A = absorbancia del reactivo ABTS con reactivo blanco

A<sub>1</sub> = absorbancia del reactivo ABTS con la muestra o estándar.

Fue tomado en base a Zhishen et al<sup>95</sup> y la fórmula siguiente permite encontrar la concentración en mol/L a partir del % de inhibición:

$$(2) y = mx + b$$

Donde:

y = % inhibición

x = concentración en mol/L= C

m = pendiente de la curva estándar trolox mol/L

b =

Para el cálculo de TAC tomamos todos los datos: cantidad de muestra, extracto obtenido.

$$(3) \text{TAC} = C \text{ mol/L} * ((s+S)/E) * ((E-R)/s) * 0.001$$

s = muestra en gramos

S = solvente metanol en gramos

E = extracto en gramos

R = residuo en gramos

- **Ensayo DPPH**

El reactivo DPPH se prepara con etanol hasta que su absorbancia sea igual a  $0.70 \pm 0.02$ , para la reacción se prepara tomando 1 mL del reactivo y se añade 100  $\mu\text{L}$  de la muestra posterior a su mezclado, se lee la absorbancia en dos tiempos, tiempo inicial o cero y a los 16-20 minutos de acuerdo a un barrido de pico máximo encontrado en el laboratorio, a 519 nm. (Modificado por Alvarado JA, 2008).<sup>105</sup>

Los cálculos son los mismos que para ABTS, con la diferencia en que la Absorbancia inicial ahora corresponde al reactivo DPPH.

- **Ensayo FRAP**

A 900  $\mu\text{L}$  de reactivo, se agregan 90  $\mu\text{L}$  de agua y 30  $\mu\text{L}$  de muestra, se homogeniza y la absorbancia se lee a 593 nm luego de la reacción. El blanco consiste en 120  $\mu\text{L}$  de agua y 900  $\mu\text{L}$  de reactivo. Las absorbancias de cada muestra se comparan con una curva estándar preparada con Trolox 100-1000  $\mu\text{mol/L}$ . Los cálculos toman directamente las ecuaciones (2) y (3).

- **Análisis del contenido de fenoles totales (TPC)**

Se toma 1 mL de este reactivo, se añade 20  $\mu\text{L}$  de la muestra, 500  $\mu\text{L}$  de solución saturada de carbonato de sodio y tras el homogenizado por 10 segundos se incuba por 30 minutos a 45°C. La absorbancia se lee a 765 nm posterior a su enfriamiento a temperatura ambiente. La absorbancia de cada muestra fue comparada con una curva estándar de ácido gálico desde 20 a 100  $\mu\text{g/L}$ . Para los cálculos emplean las ecuaciones (2) y (3).

- **Análisis del contenido de flavonoides totales (TF)**

Una solución que corresponde a 30  $\mu\text{L}$  de nitrito de sodio (10%), 60  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio hexahidratado (20%), 200  $\mu\text{L}$  de Na OH (1 M) and 400  $\mu\text{L}$  de agua fue añadida a 100  $\mu\text{L}$  de muestra. Las lecturas de absorbancia se leen a 510 nm luego de permitir la reacción. El reactivo blanco consta de todos los reactivos y agua en lugar de la muestra. Para los cálculos emplean las ecuaciones (2) y (3).

### **3.4. Expresión de resultados.**

Los resultados se ingresaron en páginas de Excel (Software 2007), y se procesaron con el Análisis de Varianza, incluyendo fórmulas de regresión lineal. Para las pruebas de determinación de Capacidad Antioxidante Total y la determinación posterior de concentración de los diferentes analitos (flavonoides y fenólicos totales), se relacionó la absorbancia con la pendiente de las curvas de calibración obtenidas.

Se compararon los resultados de los diferentes métodos y se obtuvo la correlación de Pearson valor R para cada una de las comparaciones. Las lecturas de absorbancia de la muestra se efectuaron tres veces por duplicado para obtener resultados con la suficiente robustez estadística.

En la determinación de Capacidad Antioxidante total (TAC) por la prueba de ABTS, se calculó el % de inhibición y se leyó la TAC de la curva estándar expresando en  $\mu\text{mol/g}$ . El estándar es el Trolox en diferentes diluciones.

Para la prueba de DPPH, se empleó estándar de Trolox de 20 a 200  $\mu\text{M}$ . Se calculó el porcentaje de inhibición de la absorbancia de la solución del

DPPH. A partir de éste valor se calculó el valor de TAC expresando como  $\mu\text{M/g}$  de peso seco de la muestra.

En la determinación de TAC por la prueba de FRAP se empleó el estándar Trolox, cuya curva permitió el cálculo expresado en unidades de Trolox en  $\mu\text{M}$ , de acuerdo a la curva estándar que va de 100 a 1000  $\mu\text{M}$ .

La determinación de fenoles totales trabajó con Ácido Gálico 1 mg/mL como estándar, cuya curva de calibración nos permitió obtener el resultado respectivo a expresar en mg de Equivalente de Ácido Gálico por gramo de muestra seca y  $\mu\text{mol/g}$  de muestra seca mediante cálculos.

La medición de flavonoides totales empleó una solución estándar de Catequina cuya unidad es  $\mu\text{mol/L}$  de concentración por lo tanto los resultados se presentan como  $\mu\text{mol}$  de Equivalente de Catequina por gramo de muestra seca.

Estas últimas tres determinaciones, al ser directamente proporcionales en concentración y absorbancia empleó la fórmula empleada por Peñarrieta et al<sup>16</sup>, Apak et al (Pág. 1536)<sup>26</sup> y la Guía de Laboratorio del CEIQA (Alvarado)<sup>105</sup>

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Actividad Antioxidante Total

A continuación se exponen los resultados de los ensayos y cuantificaciones obtenidos en figuras que muestran curvas de calibración y fotografías, además de tablas que llevan los resultados tabulados de TAC para cada muestra analizada. Algunas tablas se han referido a Anexos siguiendo una numeración acorde.

#### 4.1.1 Ensayo ABTS de Inhibición

En la figura 29 se muestra la curva de calibración empleando al estándar Trolox en diluciones desde 20 a 200  $\mu\text{M}$  y una fotografía de los tubos de reacción con el color característico para este ensayo, en el cual se observa que a mayor inhibición por parte del Trolox se presenta mayor decoloración del reactivo ABTS.



**Figura 29.** Curva de Calibración Estándar Trolox en  $\mu\text{M}$  para ensayo ABTS

Posteriormente se tiene las tablas 10 y 11, con los resultados determinados de Capacidad Antioxidante Total (TAC)

En los extractos se midió la actividad de secuestro de radicales libres contra el radical catión ABTS•+, por gramo de muestra seca expresados en Equivalente de Trolox en  $\mu\text{mol}$ .

**Tabla 10.** Valores de TAC en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca de cañihua por ensayo ABTS.

N°	Código	Nombre	TAC-ABTS	N°	Código	Nombre	TAC-ABTS
1	V-1	KULLACA	1.22	19	GPK-2	Kallutaca	2.49
2	V-2	ILLIMANI	1.25	20	GPB-3	Belén	1.54
3	A-88	Accesión 088	2.48	21	GNS-4	Taraco	1.29
4	A-137	Accesión 137	0.86	22	C-UM	Umala	0.93
5	A-151	Accesión 151	1.81	23	DK1	Challapata 1	9.28
6	A-155	Accesión 155	1.91	24	DK2	Challapata 2	1.01
7	A-166	Accesión 166	4.47	25	KO1	Challapata 3	0.78
8	A-173	Accesión 173	2.40	26	C-OR	Oruro	0.24
9	A-187	Accesión 187	2.93	27	C-PO	Potosí	0.15
10	A-197	Accesión 197	1.78	28	GNAR	Cochabamba	2.88
11	A-222	Accesión 222	2.95				
12	A-300	Accesión 300	2.83				
13	A-399	Accesión 399	1.21				
14	A-475	Accesión 475	1.94				
15	A-568	Accesión 568	2.12				
16	A-616	Accesión 616	3.75				
17	A-636	Accesión 636	2.23				
18	A-771	Accesión 771	1.15				

De todos los resultados, la muestra DK1 presentó la mayor capacidad antioxidante con un valor igual a 9.28 TE  $\mu\text{mol/g}$  muestra seca y el valor más bajo se determinó en la muestra C-PO de 0.15 TE  $\mu\text{mol/g}$ . Se expresa como TE, porque ésta Capacidad Antioxidante se compara al estándar Trolox, por lo que se denotándose como Equivalente Trolox. (TE). En todo el conjunto de valores se encuentra 4 niveles de TAC, donde los valores más bajos van desde 0.15 a 0.93 con 18% de las muestras, valores de inferior a medio van de 1.01 a 1.94 con un porcentaje de 39% de las muestras; muestras con valor de medio a superior se encuentran en el rango de 2.12 a 2.95 que representa el 32% de

nuestra población y los valores más altos de TAC con aproximadamente 11% de las muestras, que corresponden a 3 granos analizados, cuyo rango va de 3.75 hasta 9.28 TE  $\mu\text{Mol/g}$ .

Muchos investigadores publicaron valores de TAC muy semejantes a los de cañihua. Saura Calixto-Goñi<sup>106</sup> presentan el valor de 0.2  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca para cereales, Yu et al<sup>107</sup> mencionan 1.1 a 1.9 para trigo en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca, Ragae et al<sup>108</sup>, Gallardo et al<sup>109</sup> y Zielinsky and Kozłowska<sup>110</sup> determinaron que el centeno presentaba un rango entre 0.3 a 13  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca. De la misma manera Zielinsky y Ragae en sus publicaciones individuales presentan que el cereal cebada, posee de 2.4 a 15  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca. De todos estos cereales, el sorgo negro estudiado por Ragae et al y Awicka et al<sup>111</sup>, posee los niveles más altos desde 52 a 78  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca. Cabe concluir que los granos de cañihua se parecen bastante a los granos de centeno y cebada.

Es importante presentar a efectos de comparación, aunque las matrices sean diferentes, que el valor más alto de TAC por ABTS, mencionado por Saura Calixto<sup>112</sup> para la Fibra total de uva éste exhibió un valor significativamente alto:  $233\pm 12 \mu\text{mol Eq trolox/g}$  de muestra seca. Otros frutos evaluados cuyos valores fueron publicados por Kuskoski et al<sup>25</sup>(2005) son: la piña con el valor de  $2.9\pm 0.6$ , el mango  $11.8\pm 0.9$  y maracuyá con  $2.3\pm 0.6$  expresados en  $\mu\text{mol Eq trolox/g}$  de pulpa de fruta. Esta comparación es muy importante porque nos permite una mejor valoración de los granos de cañihua que conforman la presente investigación, que muestran la calidad de los granos de *Chenopodium pallidicaule*.

La tabla 11 presenta de forma independiente los valores de TAC por ABTS de los tres productos alimenticios, cuyo nivel de TAC es alto, tomando los

niveles anteriores, porque los valores son mayores a 3.41. Lo importante de este grupo es la presencia de harina de cañihua tostada que presenta el valor mas alto del conjunto (5.56  $\mu\text{mol Eq trolox/g}$ ), tomando en cuenta que fue sometido a calor se valora aun la presencia de Capacidad Antioxidante. Pese a no contarse con el valor de TAC de su harina inicial sin tostado es notorio que no haya perdido su capacidad antioxidante. Dato que nos permite presumir que las reacciones de pardeamiento no enzimático<sup>113</sup> (Reacción de Maillard) pudieron haber liberado sustancias fenólicas como son las melanoidinas y melaninas que sean responsables de la inhibición en el ensayo ABTS. Las granolas presentan Capacidad Antioxidante de acuerdo a su composición porque tienen el añadido de miel de caña, otro producto natural, que en ambos casos han sufrido el efecto de la temperatura porque los granos se encuentran expandidos.

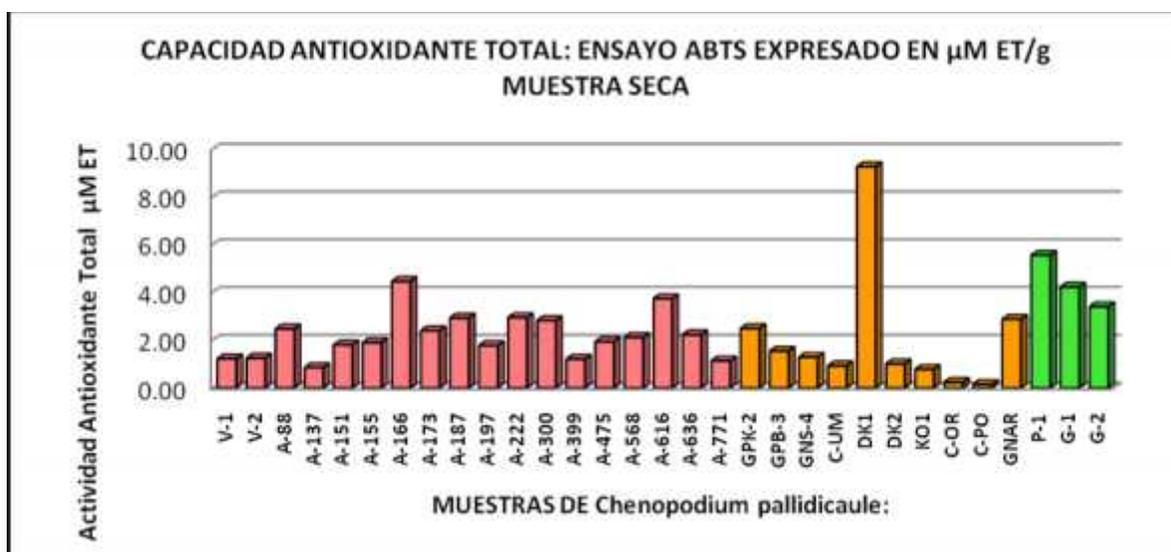
**Tabla 11.** Valores de TAC en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra en muestras comerciales por ABTS

N°	Código	Prod. Alimenticio	TAC-ABTS
1	P-1	Pito	5.56
2	G-1	Granola 1	4.23
3	G-2	Granola 2	3.41

De acuerdo a la investigación de propiedades antioxidantes de productos cereales realizada por Yu et al<sup>107</sup>, los valores de Equivalente trolox encontrados en muestras de cereales fueron 2.43, 2.40, 2.32 y 3.22  $\mu\text{mol/g}$  cereal. Estas muestras corresponden a trigo natural, avena para desayuno, harina de avena, todos productos procesados por Kellogg Co y Quaker Co y presentan los mismos efectos de granos expandidos, como las granolas. Comparando, se indica que estos valores se asemejan al segundo grupo de nuestros datos encontrados mediante este ensayo. La explicación de la similaridad de las muestras de la tabla 11, con estos productos es porque ambos tienen un

proceso de preparación y una de las variables que afecta a ambos es la temperatura, que controlada puede no perturbar el valor de TAC de las muestras.

La Capacidad Antioxidante Total en  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra se observa en la figura 30, de los cuales, los primeros 18 son granos de PROINPA, los siguientes 10 fueron colectados por CEIQA y los últimos 3 son productos de consumo. Es notorio observar la presencia de un grano con alto nivel de TAC (DK1) y de igual manera al grano que contiene la mínima cantidad (C-PO). A su vez podemos valorar las muestras A-166, A-616, GNAR con niveles representativos en sus grupos de origen.



**Figura 30.** Capacidad Antioxidante total de muestras de cañihua por ABTS

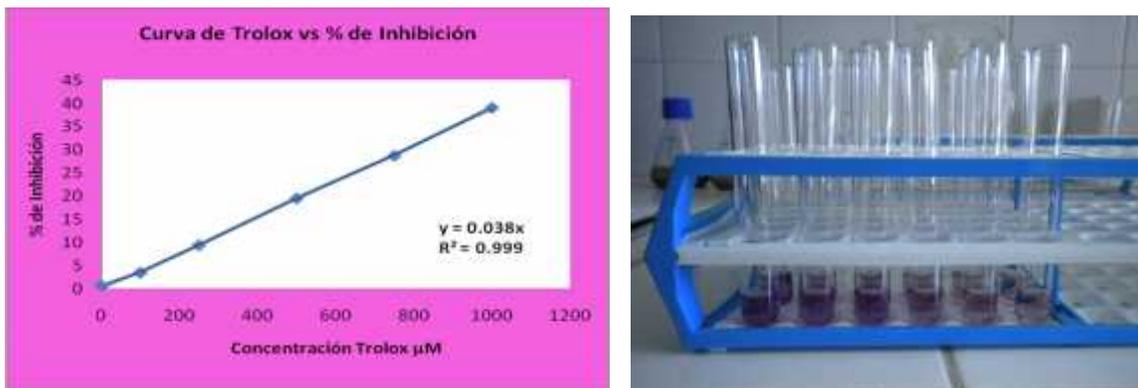
Se observa que la muestra C-PO, de la región de Potosí, tiene el valor más bajo de  $0.15 \mu\text{mol ET/g}$ . Esto podría deberse a la calidad de terreno donde se colectaron, ya que era un terreno seco e inhóspito, donde no existía mucha vegetación, la planta se mostraba como parte de la maleza silvestre. Pudiendo esto, haber influido en la síntesis de compuestos fenólicos, los que requieren como sustancias precursoras algunos aminoácidos de los cuales haya carecido

el terreno, por otro lado la falta de humedad suficiente permitieron que el valor de TAC sea el más bajo.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado en este ensayo, indica que los resultados son altamente significativos con mucha consistencia en los datos tomando un  $p < 0.05$ .

#### 4.1.2. Ensayo DPPH de Inhibición

La figura 31 muestra la curva de calibración de Trolox en reacción con el reactivo DPPH empleando diluciones desde 100 a 1000  $\mu\text{M}$ . La reacción de inhibición por parte del trolox se observa como decoloración respectiva del sustrato DPPH de un color lila oscuro a uno más claro. Leída a 519 nm de longitud de onda.



**Figura 31.** Curva de Calibración Estándar Trolox en  $\mu\text{M}$  para ensayo DPPH

Fuente: Elaboración propia

Los valores de TAC se expresaron como Equivalente de Trolox en  $\mu\text{mol/g}$  de muestra seca, los que se presentan en la Tabla 14. El ensayo DPPH se realizó con un estricto control de tiempo de reacción y la determinación de la inhibición. Se observa una clara diferenciación de niveles de Capacidad Antioxidante en todo el conjunto. Se cuenta con 3 niveles, el primero de resultados bajos con un rango de 0.95 a 4.9  $\mu\text{mol ET/g}$  con el 43 % de las

muestras, un nivel mayor desde 5.28 a 9.40  $\mu\text{mol ET/g}$  con el 39 % y un 14% de muestras cuyos valores de Actividad Antioxidante están entre 10.36 a 18.05  $\mu\text{mol ET/g}$ . Un dato importante por su valor es la muestra DK1 con 45.38  $\mu\text{mol ET/g}$  que sale de estos niveles. Dato que correlaciona muy bien con el resultado por ABTS de ésta misma muestra.

**Tabla 12.** Valores de TAC en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca de cañihua por DPPH.

N°	Código	Nombre	TAC-DPPH	N°	Código	Nombre	TAC-DPPH
1	V-1	KULLACA	4.40	19	GPK-2	Kallutaca	9.40
2	V-2	ILLIMANI	5.50	20	GPB-3	Belén	5.28
3	A-88	Accesión 088	10.36	21	GNS-4	Taraco	4.90
4	A-137	Accesión 137	2.54	22	C-UM	Umala	3.38
5	A-151	Accesión 151	6.01	23	DK1	Challapata 1	45.38
6	A-155	Accesión 155	8.25	24	DK2	Challapata 2	1.93
7	A-166	Accesión 166	18.05	25	KO1	Challapata 3	4.43
8	A-173	Accesión 173	7.14	26	C-OR	Oruro	0.95
9	A-187	Accesión 187	7.89	27	C-PO	Potosí	1.12
10	A-197	Accesión 197	5.72	28	GNAR	Cochabamba	14.07
11	A-222	Accesión 222	8.84				
12	A-300	Accesión 300	10.71				
13	A-399	Accesión 399	5.84				
14	A-475	Accesión 475	2.61				
15	A-568	Accesión 568	6.87				
16	A-616	Accesión 616	4.75				
17	A-636	Accesión 636	3.68				
18	A-771	Accesión 771	3.44				

En las muestras de PROINPA, se observa que descollan por su valor las muestras A-166, A-300 y la A-88 con valores de 18.05, 10.71 y 10.36  $\mu\text{mol ET/g}$  respectivamente. En cuanto a las muestras silvestres, la muestra GNAR posee un valor importante de 14.07  $\mu\text{mol ET/g}$  y el GPK-2 con 9.40  $\mu\text{mol ET/g}$ . En cambio existen dos muestras que al igual que en el ensayo ABTS, dieron un

valor bajo en relación al conjunto y corresponden a C-OR y C-PO con 0.95 y 1.12  $\mu\text{mol ET/g}$  respectivamente.

Repo-Carrasco en colaboración de Encina C, (2008)<sup>10</sup>, realizó la determinación de Actividad Antioxidante de 11 muestras de cañihua cultivadas en tierras peruanas, encontrando que la variedad Puka cañihua presentó la mayor TAC de las 11 muestras, con un valor de 6.029  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra y el valor mínimo correspondió a la muestra Pik030 273 con 0.36  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra. La autora indica que los valores de TAC en granos de cañihua realmente son importantes porque son similares y hasta mayores a los TAC de productos como la mora y la quiwicha, entre otros, cuyos valores son: 7.13  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra y 2.63  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra. El presente trabajo corrobora la conclusión por los valores obtenidos en diferentes granos de cañihua.

La misma investigadora Repo-Carrasco et al<sup>11</sup> el 2009, determinaron Capacidad Antioxidante Total de dos variedades de cañihua: Cupi y Ramis: 4200 $\pm$ 5.5 y 4050 $\pm$ 5.33  $\mu\text{g trolox eq/g.d.b}$ , que si realizamos la transformación en  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra seca (Ver anexo 9), concluimos que las variedades de cañihua Cupi y Ramis tienen una actividad antioxidante de 16.78  $\mu\text{mol ET/g}$  y 16.18  $\mu\text{mol ET/g}$ , valores que se comparan con la muestra A-166 cuya actividad fue 18.05  $\mu\text{mol ET/g}$ , sin embargo inferiores a la muestra DK1 cuyo valor fue aún más alto.

Por otro lado, Bonoli et al<sup>88</sup> publicaron la determinación de TAC en extracto metanol/agua, del cereal cebada mediante DPPH, cuyo valor fue 103.87 expresado como  $\mu\text{mol ET/ 100 g}$  de harina de cebada, referido este valor a simplemente gramo de muestra tenemos el resultado de 1.0387  $\mu\text{mol ET/g}$  de harina, dato que corresponde al nivel bajo de los niveles con los que contamos, esta Actividad Antioxidante de cebada se encuentra en el rango de las muestras

más pobres en Actividad Antioxidante como son C-OR y C-PO de nuestro análisis.

De acuerdo a la investigación de Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>, estos reportaron valores de TAC mediante el ensayo DPPH, para cereales como amaranto, quinua, trigo sarraceno y trigo, los valores siguientes: 1.134  $\mu\text{mol ET/g}$ , 2.3053  $\mu\text{mol ET/g}$ , 24.77  $\mu\text{mol ET/g}$  y 1.76  $\mu\text{mol ET/g}$  respectivamente. Revisando los mismos concluimos que la característica inhibidora de los antioxidantes de las muestras de cañihua fueron mejores, inclusive la muestra más rica en antioxidantes como el trigo sarraceno se encuentra por debajo de la muestra DK1.

La tabla 13 presente comparaciones con otras matrices alimenticias, de acuerdo a publicaciones internacionales<sup>25</sup>, en la que se observa: pulpa de frutas tropicales del país vecino Brasil con valores similares a los de cañihua.

**Tabla 13.** Valores de TAC en pulpa de frutos aplicando DPPH

<b>Muestra</b>	<b>TAC por DPPH <math>\mu\text{mol ET/g}</math> muestra</b>	<b>Muestra</b>	<b>TAC por DPPH <math>\mu\text{mol ET/g}</math> muestra</b>
Piña	0.5 $\pm$ 0.01	Fresa	9.2 $\pm$ 0.01
Maracuyá	0.9 $\pm$ 0.2	Mango	12.9 $\pm$ 0.2
Uva	7.0 $\pm$ 0.3	Acerola	53.2 $\pm$ 5.3

Fuente: Extraído de artículo de Kuskoski E, et al (2005)<sup>25</sup>

Es importante rescatar que granos pequeños de no más de 1 mm de diámetro puedan equiparar su Capacidad Antioxidante a la de frutos que son más grandes en dimensiones. Como se puede observar en la tabla anterior, el

valor de éste grano además es su forma sólida que permite mayor tiempo de conservación y uso, a diferencia de los frutos mencionados.

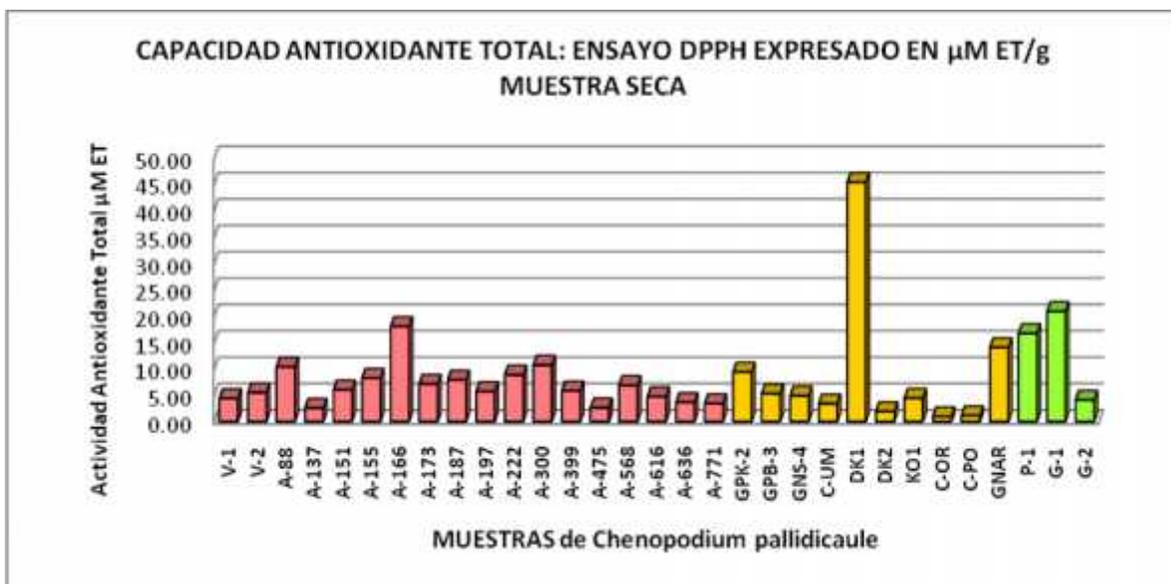
Los resultados de TAC de los productos alimenticios se encuentran en la tabla 14. Los datos son importantes porque en comparación de ABTS se observa diferencia entre los resultados de las muestras granolas, esto se explicaría por la reacción de inhibición muy propia de DPPH cuyo sustrato es bastante lábil a temperatura y tiempo de exposición en el ambiente.

**Tabla 14.** Capacidad Antioxidante Total en muestras comerciales.

N°	Código	Producto Alimenticio	TAC-DPPH
1	P-1	Pito	16.72
2	G-1	Granola 1	20.89
3	G-2	Granola 2	4.07

La muestra G-1 presentó el valor más alto: 20.89  $\mu\text{mol}$  de ET/g de muestra seca. Es notorio el caso de la harina de cañihua “pito”, que aún muestra un valor alto de 16.72  $\mu\text{mol}$  ET/g de muestra seca pero es inferior a la anterior. Revisando los componentes químicos de las muestras, se explicaría que la inhibición del sustrato en este ensayo se debió a compuestos fenólicos importantes producidos por el efecto de tostado de los granos (Reacción de Maillard )<sup>113</sup>

Graficando los valores de las tablas, presentamos la siguiente relación de muestras versus Capacidad Antioxidante Total en  $\mu\text{mol}$  ET/g muestra, cuyos valores inferior y superior fueron: 0.95 hasta 45.38  $\mu\text{mol}$  ET/ g muestra, respectivamente.



**Figura 32.** Capacidad Antioxidante Total de muestras de cañihua por ensayo DPPH

La gráfica nos permite observar que la muestra DK1, es una muestra muy rica en compuestos inhibidores que mostraron un alto valor de TAC, aún por encima de las muestras comerciales. Sin embargo es importante notar que la muestra G-2, tuvo un comportamiento diferente en éste ensayo, ya que podría haberse esperado una respuesta parecida al ensayo ABTS, porque ambos tienen el mecanismo de inhibición similar, pero el sustrato diferente permitió un valor inferior, incluso frente a las muestras de PROINPA. Por otro lado a diferencia de los ensayos ABTS y FRAP, los valores son muy altos en la muestra DK1, esto no es de sorprender ya que la química de las diferentes reacciones es muy propia de cada ensayo, además este mismo patrón se presenta en el trabajo publicado por Thaipong et al <sup>89</sup> donde los ensayos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC tuvieron correlación pero rangos diferentes en el análisis de extractos de la guava. Además se conoce que muchas sustancias fenólicas pueden presentar efectos prooxidantes en ciertas condiciones o bien que algunas proteínas podrían entorpecer las reacciones enmascarando a los mismos cuya expresión sería nula. Esta podría ser una explicación para el

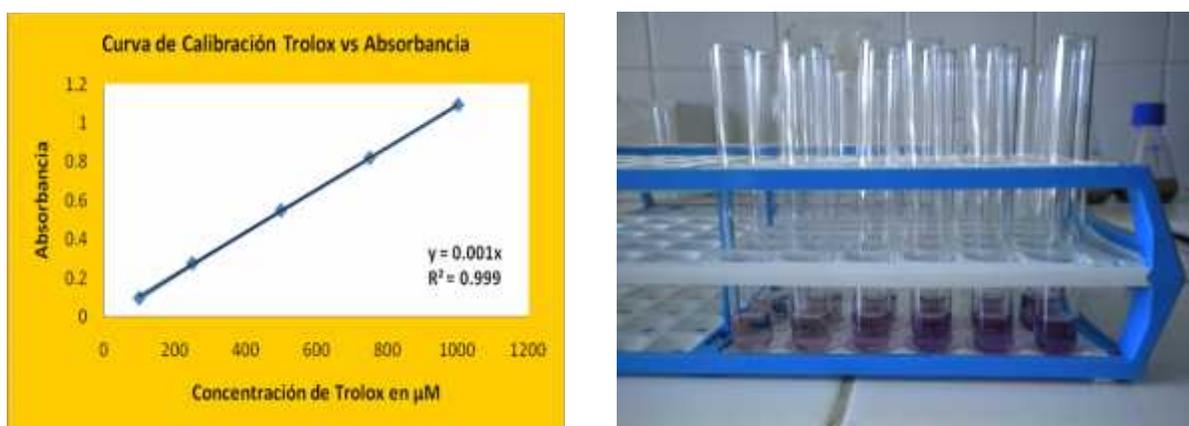
hecho observado, porque el producto es una combinación de varios alimentos.<sup>86</sup>

La determinación de DPPH pese a ser una prueba sencilla, rápida tiene un comportamiento sensible al tiempo de reacción, algunos compuestos pueden reaccionar de forma lenta y paulatina, aunque se otorgó hasta 20 minutos para la misma, podría ser que la matriz de algunos productos no concluyeran su reacción completa, explicando así el valor de G-2.

En cuanto al análisis ANOVA realizado a los datos, estos muestran que los resultados mediante este ensayo son altamente significativos tomando un  $p < 0.05$

#### 4.1.3. Ensayo FRAP

Para los resultados de este ensayo se presentan la curva estándar de trolox desarrollada en base a la reacción TPTZ y  $\text{AlCl}_3$  en diluciones desde 100 a 1000  $\mu\text{M}$ , leída a 593 nm de longitud de onda. La figura 33 muestra el desarrollo de color en forma proporcional a la concentración del estándar.



**Figura 33.** Curva de Calibración de estándar Trolox en  $\mu\text{M}$  para ensayo FRAP.

El presente análisis no es de inhibición como los anteriores, por lo que la concentración de Antioxidantes es proporcional a la coloración formada en los tubos de reacción. Los resultados están expresados en  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra seca.

La tabla 15, presenta los resultados de los 28 granos de cañihua. De los cuales un 46 % tienen valores en un rango de 0.81 a 1.87  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra, un segundo grupo del 39% con rango de 2 a 2.63  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra y un tercer grupo con 11% de las muestras de 3.36 a 4.61  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra.

**Tabla 15.** Valores de TAC en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca de cañihua por FRAP

N°	Código	Nombre	TAC-FRAP	N°	Código	Nombre	TAC-FRAP
1	V-1	KULLACA	1.23	19	GPK-2	Kallutaca	2.35
2	V-2	ILLIMANI	1.38	20	GPB-3	Belén	1.55
3	A-88	Accesión 088	4.61	21	GNS-4	Taraco	1.33
4	A-137	Accesión 137	0.81	22	C-UM	Umala	1.22
5	A-151	Accesión 151	2.63	23	DK1	Challapata 1	8.96
6	A-155	Accesión 155	1.87	24	DK2	Challapata 2	2.06
7	A-166	Accesión 166	4.08	25	KO1	Challapata 3	0.95
8	A-173	Accesión 173	1.55	26	C-OR	Oruro	0.97
9	A-187	Accesión 187	2.39	27	C-PO	Potosí	0.84
10	A-197	Accesión 197	1.45	28	GNAR	Cochabamba	3.36
11	A-222	Accesión 222	2.02				
12	A-300	Accesión 300	2.40				
13	A-399	Accesión 399	1.58				
14	A-475	Accesión 475	2.30				
15	A-568	Accesión 568	2.49				
16	A-616	Accesión 616	2.09				
17	A-636	Accesión 636	2.00				
18	A-771	Accesión 771	2.44				

Se observa que la muestra DK1 tuvo una reacción similar a los anteriores ensayos, posee el valor más alto de todo el grupo: 8.96  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra. Los valores más bajos fueron para A-137 y C-PO, 0.81 y 0.84  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra respectivamente. En la muestra A-137 (0.81  $\mu\text{mol ET/g}$ ) se presenta una

variante clara de reacción entre los métodos ABTS, DPPH frente al ensayo FRAP que explicaría la presencia de diferentes compuestos fenólicos y flavonoides que actúan de manera diferente en éste medio de reacción.

La tabla 16 muestran valores de FRAP para algunos alimentos descritos en publicación de Halvorsen et al.<sup>90</sup>

**Tabla 16.** Relación de mM/100 de Actividad Antioxidante por 100 g de alimento.

ALIMENTO	Método FRAP mmol/100 g	ALIMENTO	Método FRAP mmol/100 g
Espicias y hierbas	0.803-125.549	Cereales instantáneos	0.157-4.291
Almendras y frutos secos	0.029-13.126	Postres y tortas	0.00-4.097
Chocolates y dulces	0.092-10.474	Moras y productos	0.978-4.059
<b>Vegetales y productos vegetales</b>	<b>0.018-4.694</b>	Frutas y jugos de frutas	0.081-2.512

Fuente: Extraído de Halvorsen et al, 2006

Del cual podemos desprender el valor de vegetales y productos vegetales y comparar con el rango de valores que se obtuvo en el presente trabajo. Transformando la unidad de mmol/100 g a  $\mu\text{mol/g}$  de muestra, el valor de vegetales estará en un rango de 0.18 a 46.94  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra, intervalo en el cual ingresan los valores de granos de cañihua, nuestros valores van desde 0.81 a 8.96  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra.

De acuerdo a Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>, el análisis de TAC por ensayo FRAP en cereales como amaranto, quinua, trigo sarraceno y trigo permite conocer que estas especies poseen: 2.21  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca, 3.68  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca, 17.42  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca y 4.40  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra seca respectivamente. Estos datos son muy importantes porque la literatura en éste ensayo es insuficiente para cereales cuya matriz es similar a la cañihua. Revisando se observa que los granos de cañihua se encuentran en un sitio importante tomando en cuenta estos cereales. Realizada la evaluación se

obtiene que de mayor TAC a menor TAC, tenemos la siguiente relación: Trigo sarraceno > **Cañihua** > Trigo > Quinoa > Amaranto.

De acuerdo a los estudios de Apak<sup>26</sup>, los valores de TAC de algunas frutas y vegetales mediante el ensayo FRAP, se presentan en la tabla 17. Entre los cuales la naranja es un buen antioxidante con valor de 11.81, sin embargo los granos de cañihua se encuentran a la par de los valores de lechuga, plátanos, manzana, tomate, cebolla y nuestro mayor valor se parece al del brócoli.

**Tabla 17.** Valores de TAC mediante FRAP para frutas y vegetales.

Fruta	FRAP $\mu$ mol/g muestra	Vegetal	FRAP $\mu$ mol/g muestra
Naranja	11.81	Brócoli	8.33
Plátano	1.64	Tomate	3.44
Manzana	3.94	Lechuga	1.24
Espinaca	10.09	Cebolla	3.69

Fuente: Apak, 2007<sup>26</sup>

Perez-Jimenez y Saura-Calixto<sup>115</sup> publicaron que el análisis de hortalizas españolas tenían un TAC de  $10.3 \pm 0.1 \mu\text{mol ET/g}$  muestra seca, aunque este rango procede de otra matriz, es importante para evaluar los valores del presente trabajo porque mantienen la correlación de valores, nuestro valor máximo fue de  $8.96 \mu\text{mol ET/g}$  muestra seca.

En la investigación realizada por Araya H et al<sup>116</sup>, en el país vecino de Chile, se presentó valores de frutas y vegetales que fueron evaluados mediante el ensayo FRAP, presentamos la tabla 18 de vegetales que nos permitirán comparar los valores de los diferentes granos de cañihua con otros vegetales analizados, expresando en  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra húmeda o fresca.

**Tabla 18.** TAC mediante FRAP de vegetales chilenos

<b>Verdura</b>	<b>μmol/g</b>	<b>Verdura</b>	<b>μmol/g</b>
Acelga (Beta vulgaris var. Cicla)	1.90 ± 0,014	Cilantro (Coriandrum sativum)	12.31 ± 0,126
Ajo (Allium sativum)	1.25 ± 0,006	Espárrago (Asparagus officinalis)	2.33 ± 0,008
Ajo cocido (Allium sativum)	0.21 ± 0,004	Espinaca (Spinacia oferacea)	2.74 ± 0,030
Ají rojo (Capsicum spp)	19.11 ± 0,051	Espinaca coc.(Spinacia oferacea)	2.10 ± 0,029
Ají verde (Capsicum spp)	6.67 ± 0,081	Orégano (Lippia spp)	6.88 ± 0,032
Alcachofa (Cynara scolymus)	3.53 ± 0,045	Palta (Persea americana)	1.67 ± 0,020
Betarraga cocida (Beta vulgaris)	10.55 ± 0,223	Perejil (Petroselinum crispum)	5.04 ± 0,021
Brocoli (Brassica oleracea)	1.21 ± 0,029	Pimentón rojo (Capsicum annum)	6.18 ± 0,025
Cebolla (Allium cepa)	2.59 ± 0,039	Zanahoria cru. (Daucus carota)	0.27 ± 0,004
Cebolla cocida (Allium cepa)	0.62 ± 0,004	Zanahoria coc. (Daucus carota)	0.15 ± 0,004

Fuente: Extraído de Araya et al <sup>116</sup>

Los alimentos con mayor valor TAC son el ají rojo, betarraga cocida, cilantro con datos mayores a 10 μmol/g muestra fresca y el valor más bajo presenta la zanahoria cocida con 0.15 μmol/g muestra fresca. Esto nos indica que dietas pobres en estas verduras podrían al menor ser reemplazadas por platos elaborados a base de granos de cañihua que otorgarían la misma calidad en cuanto a capacidad antioxidante.

En cuanto a las muestras comerciales estas presentaron el mismo rango de valores encontrado en el ensayo de ABTS, aunque como sabemos sus principios de reacción son diferentes. Ellas se encuentran tabuladas en la tabla 19, expresadas en μmol/g de muestra seca. El valor más alto es para el pito de

cañihua con un valor de 4.55 y el más bajo la G-2 con valor de 1.51  $\mu\text{mol/g}$  de muestra seca.

**Tabla 19.** Capacidad Antioxidante en muestras comerciales obtenidas por ensayo FRAP

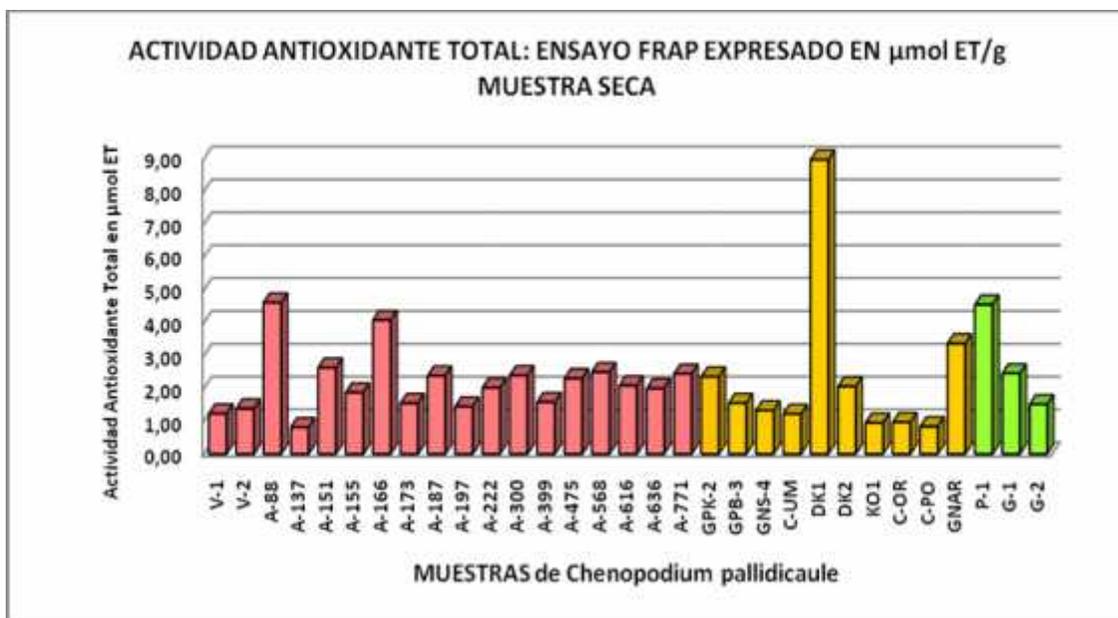
N°	Código	Producto Alimenticio	TAC-DPPH
1	P-1	Pito	4.55
2	G-1	Granola 1	2.45
3	G-2	Granola 2	1.51

En la investigación desarrollada por Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>, se presenta la determinación de TAC en muestras de los granos pero sometidos a temperatura porque las muestras se encuentran como alimentos horneados, donde se pone de manifiesto la disminución de los valores de TAC al ser sometidos a ésta variable. Es así que la muestra de quinua cuyo valor era de  $92.1 \pm 1.7$  mg TE/100 g muestra seca, como alimento horneado su valor posterior fue de  $71.4 \pm 2.8$  mg TE/100 g de muestra, en el trigo sarraceno disminuyó de  $436 \pm 12.8$  a  $148 \pm 4.6$  mg TE/100 g de muestra, el trigo de  $110 \pm 4.7$  a  $81.7 \pm 1.6$  mg TE/100 g de muestra, la excepción es el amaranto cuyo valor aumenta desde  $55.3 \pm 1.6$  a  $60.6 \pm 6.2$ .

Las variaciones en los datos de Capacidad Antioxidante de los cereales son hasta esperadas, porque existen muchos factores como los genéticos, proceso agro técnico, condiciones del ambiente que pueden influenciar en la presencia de componentes fenólicos que responden a éste y los demás ensayos. No obstante una comparación de resultados de diferentes estudios es dificultosa debido a la variabilidad en las condiciones experimentales además de los ensayos empleados. Pero a pesar de estas variaciones, tenemos que las muestras de cañihua presentan un buen nivel de Capacidad Antioxidante frente al trigo sarraceno que es una gran fuente de Capacidad Antioxidante conocido y

estudiado por investigadores como Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>, Yongyan et al<sup>117</sup> y Danihelová et al.<sup>118</sup>

Representado en la gráfica 34, la Capacidad Antioxidante en  $\mu\text{mol}$  de ET/g muestra analizada, se observa a los primeros 18 valores del Banco de germoplasma, las restantes 10 proceden de los muestreos del presente proyecto y las 3 últimas corresponden a los alimentos a base de cañihua. En la gráfica se puede percibir los 3 niveles de Actividad Antioxidante en todo el conjunto de muestras.



**Figura 34.** Capacidad Antioxidante Total de muestras de cañihua por Ensayo FRAP  
Fuente: Elaboración propia

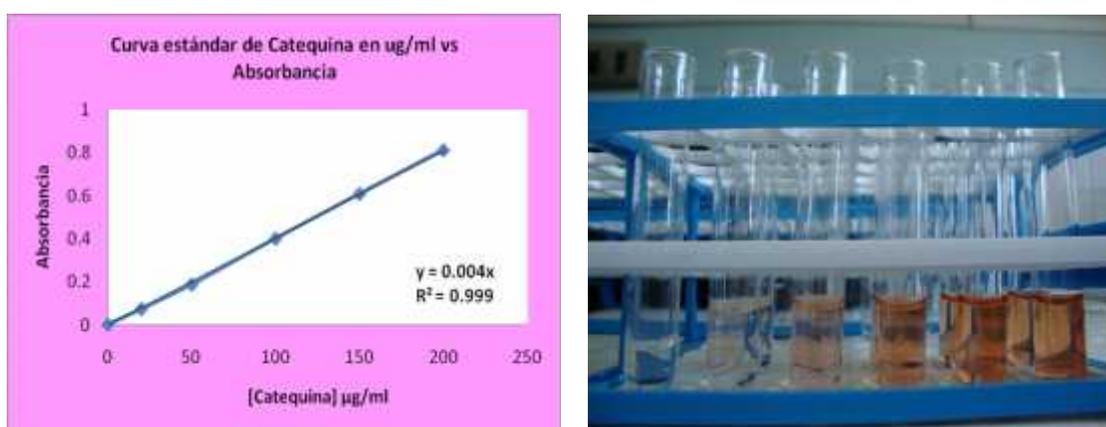
La muestra DK1 es la más sobresaliente con el valor más alto y la que posee menor Actividad Antioxidante es la muestra A-137.

Realizado el análisis ANOVA, los resultados de los tratamientos y repeticiones muestran que la diferencia entre los datos de actividad antioxidante son altamente significativos por este ensayo FRAP con una  $p < 0.05$ .

#### 4.1.4. Cuantificación de metabolitos flavonólicos y fenólicos

- **Resultados de Concentración de Flavonoides Totales (TP)**

Para la cuantificación de Flavonoides Totales contamos con la curva Estándar que irá expresado en mg de EC/g, que es el Equivalente de Catequina cuyas concentraciones van de 20 a 200  $\mu\text{g}$  EC/ml. La figura 35 muestra la ecuación de regresión lineal obtenida y la fotografía corrobora las coloraciones obtenidas por reacción leídas en espectrofotómetro a 510 nm de longitud de onda.



**Figura 35.** Curva de calibración de Catequina para determinación de Flavonoides totales.

Una vez realizada la cuantificación de las 31 muestras, se presenta la concentración de Flavonoides totales encontrada, expresadas en mg Equivalente de Catequina / g de muestra seca. En la tabla 20 se observa un rango de valores desde un mínimo 0.09 hasta un valor máximo de 0.83 mg CE/g de muestra que corresponde a concentración de flavonoides totales (TF). Clasificando los valores de acuerdo a su dato numérico observamos la misma tendencia de los anteriores ensayo, subdivididos en 4 grupos desde un rango mínimo 0.09 a 0.16 con el 43%, un rango menor de 0.20 a 0.29 con un 29% de las muestras, un valor mayor con porcentaje de 21% cuyo rango va de 0.31 a

0.37 y los valores máximos encontrados con el 7%, representando a 2 muestras cuyos valores fueron: 0.61 y 0.83 que corresponden a C-UM y DK1.

**Tabla 20.** Concentración de Flavonoides Totales en muestras de Cañihua, expresados en mg Equivalente de Catequina / g muestra seca

N°	Código	Nombre	FLAV TOTAL	N°	Código	Nombre	FLAV TOTAL
1	V-1	KULLACA	0.14	19	GPK-2	Kallutaca	0.21
2	V-2	ILLIMANI	0.14	20	GPB-3	Belén	0.10
3	A-88	Accesión 088	0.21	21	GNS-4	Taraco	0.12
4	A-137	Accesión 137	0.09	22	C-UM	Umala	0.61
5	A-151	Accesión 151	0.16	23	DK1	Challapata 1	0.83
6	A-155	Accesión 155	0.14	24	DK2	Challapata 2	0.34
7	A-166	Accesión 166	0.37	25	KO1	Challapata 3	0.14
8	A-173	Accesión 173	0.16	26	C-OR	Oruro	0.12
9	A-187	Accesión 187	0.31	27	C-PO	Potosí	0.09
10	A-197	Accesión 197	0.20	28	GNAR	Cochabamba	0.37
11	A-222	Accesión 222	0.36				
12	A-300	Accesión 300	0.25				
13	A-399	Accesión 399	0.11				
14	A-475	Accesión 475	0.22				
15	A-568	Accesión 568	0.28				
16	A-616	Accesión 616	0.32				
17	A-636	Accesión 636	0.29				
18	A-771	Accesión 771	0.26				

Las últimas muestras son cañihuas silvestres con un nivel de flavonoides importante. La muestra con menor valor en el conjunto de datos fueron A-137 y C-PO con el valor de 0.09 mg CE/g de muestra.

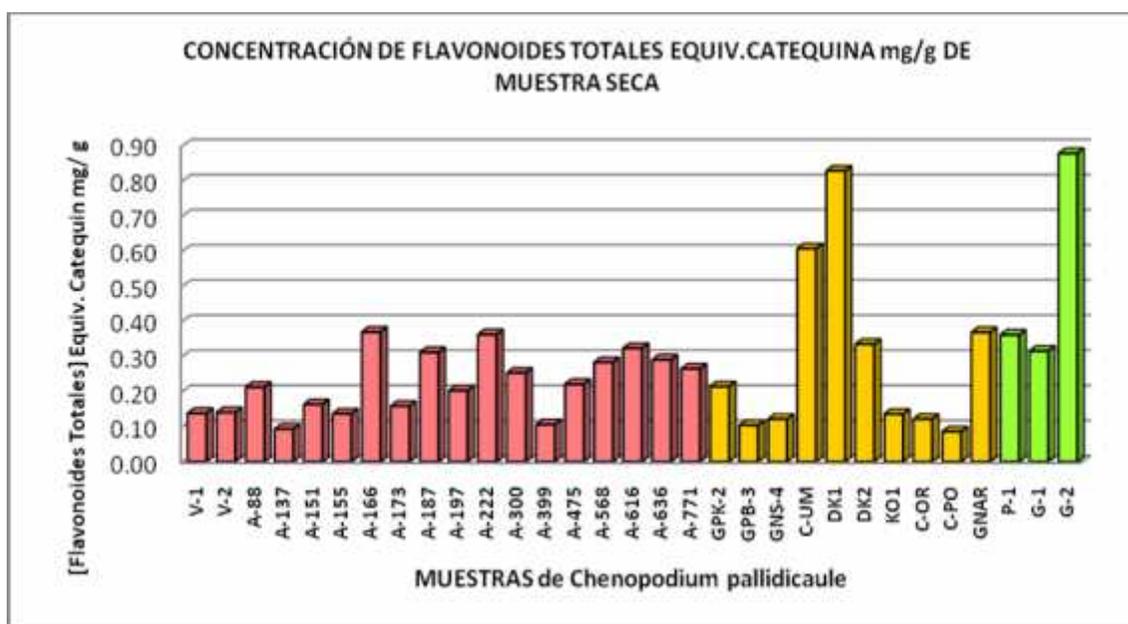
La tabla 21 presenta el resultado de Flavonoides totales en las tres muestras de consumo inmediato.

**Tabla 21.** Concentración de Flavonoides Totales en muestras de consumo

N°	Código	Producto Alimenticio	FLAV TOTAL
1	P-1	Pito	0.36
2	G-1	Granola 1	0.32
3	G-2	Granola 2	0.88

De forma contrastante en relación a las pruebas anteriores se observa que la muestra de G-2 presentó una concentración más alta que los otros dos productos alimenticios, lo cual se justifica por la presencia de sus ingredientes.

En la figura 36 se observa claramente los 4 grupos de Concentración de Flavonoides, donde, a diferencia de los ensayos anteriores las muestras: DK1 y G-2 poseen casi el mismo valor.



**Figura 36.** Concentración de Flavonoides totales en muestras de Cañihua, expresado en equivalentes de Catequina mg/g de Muestra Seca

La presencia de flavonoides en cereales es importante, por ejemplo por Gonzalez-Sanjosé <sup>119</sup> reportaron presencia de proantocianidina en diferentes variedades de cebada. El rango de flavanoles totales fue de 0.325 a 0.527 mg EC/g. Por otro lado la presencia de antocianinas es importante porque forman parte de los pigmentos lilas, azul, rosado y rojo de flores, frutas y vegetales tanto como cereales coloreados. Se cita estas características de color, porque muchos de los granos analizados presentan coloraciones amarillas, naranjas y hasta rojas. Algunos estudios de antocianinas coloreadas presentes en cereales y su consumo se han relacionado con la salud por Garzón el año 2008<sup>120</sup>

A falta de otros datos de flavonoides en cereales, tomamos datos de flavonoides en frutas desarrollado por Karadeniz et al<sup>121</sup>, quienes estudiaron manzanas (*Malus domestica* B.) de la variedad Granny Smith y Arapkizi, cuyos valores fueron  $282 \pm 85.2$  mg CE/kg de muestra y  $823 \pm 103.2$  mg CE/kg de muestra, en uva (*Vitis vinífera* L.) entre  $452 \pm 155$  y  $1069 \pm 45.6$  mg CE/kg de muestra. Tomando en cuenta otros vegetales como la papa (*Solanum tuberosum*)  $153 \pm 38.2$ , cebollas (*Allium cepa*)  $170 \pm 60.8$ . Nuestro rango de valor se encuentra muy relacionado a éstos datos, donde la muestra DK1 tiene un valor muy similar de la manzana variedad Arapkizi.

Según un estudio realizado por Palomo et al<sup>122</sup> el contenido de flavonoides en las frutas está influenciado por diferentes factores como el cultivar, nutrición mineral de la planta, zona climática donde se desarrolla. Acerca de la muestra C-PO, cuyo valor fue el más bajo, ésta investigación nos explica la medición obtenida, porque la muestra procede de un paraje bastante carente de cuidado y humedad (región de Potosí).

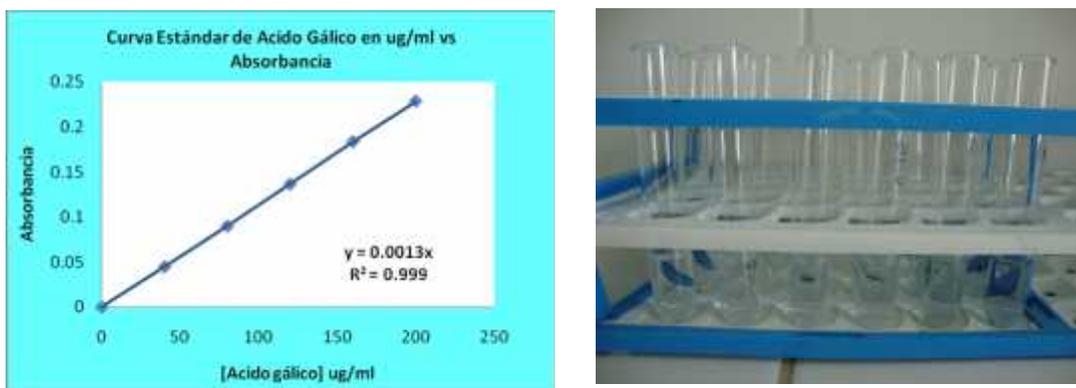
Es importante indicar que en ésta prueba se presenta la formación de una opalescencia cuando se añaden los reactivos al sistema de reacción que de

alguna manera altera la lectura de las absorbancias, razón por la que este trabajo empleó un proceso de centrifugación de las muestras para contar con soluciones limpias y claras que puedan ser leídas en el espectrofotómetro. Se explica el hecho ya que la presencia de compuestos como proteínas, taninos u otros pueden estar ligados a las estructuras flavonoides ocasionando tal opalescencia.

Realizado el Análisis de varianza, se observa que entre las muestras existe una diferencia altamente significativa considerando un  $p < 0.05$ .

- **Resultados de Concentración de Fenoles Totales (TPC)**

La curva de calibración empleando Acido gálico como sustancia estándar presenta el siguiente patrón de reacción, donde existe proporcionalidad entre la concentración de fenólicos y la absorbancia creciente, demostradas por la fotografía que presenta el tenue color celeste que va en aumento, desde una dilución de 50 a 200  $\mu\text{g/ml}$  de Acido gálico, por lo que las unidades de los resultados obtenidos serán en  $\text{mg GAE/g}$  de muestra seca.



**Figura 37.** Curva Estándar de Acido gálico  $\text{mg GAE/ml}$

La fórmula de cuantificación de este metabolito secundario, consideró todo el tratamiento realizado desde el proceso de extracción hasta su lectura final, de

acuerdo a la guía del CEIQA. En la tabla siguiente se presenta todos los valores de las cañihuas expresadas en GAE mg/g de muestra seca.

La muestra silvestre DK1 posee el valor más alto del grupo con 1.06 mg GAE/g muestra seca, y entre las accesiones la A- 300 presenta 0.94 mg GAE/g muestra seca y la con menor valor de TAC es la muestra de Oruro con valor de 0.25 mg GAE/g muestra seca. Existe una clara diferenciación de cuatro niveles donde un nivel bajo posee un 32% de las muestras con rango desde 0.24 a 0.39 mg GAE/g, el segundo grupo del 32% van de 0.40 a 0.58 mg GAE/g, un tercer grupo con un 21% tienen entre 0.61 a 0.65 mg GAE/g. El cuarto grupo que posee valores más altos del grupo con un 15% se encuentran desde un 0.70 hasta 1.06 mg GAE/g muestra.

**Tabla 22.** Concentración de Fenoles Totales en muestras de cañihua como mg GAE/g muestra

N°	Código	Nombre	FENOLES TTALS	N°	Código	Nombre	FENOLES TTALS
1	V-1	KULLACA	0.63	19	GPK-2	Kallutaca	0.61
2	V-2	ILLIMANI	0.52	20	GPB-3	Belén	0.38
3	A-88	Accesión 088	0.40	21	GNS-4	Taraco	0.46
4	A-137	Accesión 137	0.30	22	C-UM	Umala	0.30
5	A-151	Accesión 151	0.52	23	DK1	Challapata 1	1.06
6	A-155	Accesión 155	0.55	24	DK2	Challapata 2	0.24
7	A-166	Accesión 166	0.65	25	KO1	Challapata 3	0.31
8	A-173	Accesión 173	0.65	26	C-OR	Oruro	0.25
9	A-187	Accesión 187	0.64	27	C-PO	Potosí	0.51
10	A-197	Accesión 197	0.51	28	GNAR	Cochabam	0.58
11	A-222	Accesión 222	0.76				
12	A-300	Accesión 300	0.94				
13	A-399	Accesión 399	0.61				
14	A-475	Accesión 475	0.70				
15	A-568	Accesión 568	0.31				
16	A-616	Accesión 616	0.51				
17	A-636	Accesión 636	0.39				
18	A-771	Accesión 771	0.30				

Realizada la misma determinación de fenoles totales en granos de cañihua, la investigadora Repo Carrasco et al<sup>11</sup>, publicó que dos variedades cultivadas en latitudes peruanas, denominadas Cupi y Ramis presentaron  $2.54 \pm 1.2$  y  $2.43 \pm 1.35$  mg GAE/ g muestra seca. Comparadas a ellas los valores del presente trabajo están por debajo, sin embargo debe tomarse en cuenta la desviación estándar que tienen que la hace solo un poco mayor a las cañihuas nuestras, en especial a las muestras del cuarto grupo cuyo valor va de 0.70 a 1.06 mg GAE/g, es importante aclarar que en la publicación existe una ambigüedad porque en la sección de resultados y discusión emplea los microgramos de GAE/g, entre tanto que en la tabla de resultados expresa como mg GAE/g muestra seca.

En una de las últimas investigaciones de cereales con efecto antioxidante, Danihelová<sup>118</sup> encontró que el contenido total de polifenoles estaba en un rango de 1.6667 a 6.3531 mg GAE/g de muestra húmeda. Este dato es muy importante para valorar el presente trabajo, ya que uno de los valores altos con los que contamos se acerca al valor inferior, tomando en cuenta que ambos son cereales.

Niveles significativos de polifenoles fueron determinados en amaranto, quinua, trigo sarraceno y trigo, en la publicación de Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>. Ellos reportaron que los granos de estos cereales contenían  $0.212 \pm 2.3$  mg GAE/g muestra seca,  $0.717 \pm 5.5$  mg GAE/g muestra seca,  $3.23 \pm 14.1$  mg GAE/g muestra seca y  $0.531 \pm 2.8$  mg GAE/g muestra seca respectivamente. Los valores de las 28 muestras de cañihuas estudiadas se encuentran entre éstos valores, determinándose que en cuanto a concentración de fenoles totales desde el mayor hasta el menor valor tendremos la siguiente relación: trigo sarraceno > **cañihua** > trigo > quinua > amaranto.

En investigación realizada por Muñoz et al<sup>123</sup> se evaluó la Capacidad Antioxidante empleando 9 plantas promisorias peruanas, donde los valores encontrados de Fenoles en mg GAE/ g de muestra tienen un rango de 0.0216 hasta 23.9372. Los datos obtenidos se observan en la tabla 23.

**Tabla 23.** Capacidad antioxidante de nueve plantas promisorias peruanas.

<b>Muestra</b>	<b>Fenoles mg GAE g</b>	<b>Muestra</b>	<b>Fenoles mg GAE/g</b>
Aguaymanto	1.0089	Camu-camu	23.9372
Carambola	0.7597	Tumbo serrano	14.7826
Tomate árbol	0.6271	Noni	1.6477
Yacón	0.6764	Guinda	0.2405
Tumbo costeño	0.0216		

Fuente: Extraído de Muñoz<sup>123</sup>

De la comparación con estos alimentos, podemos concluir que los granos de cañihua poseen una concentración de fenoles totales muy parecidos a los de aguaymanto, carambola, tomate árbol, yacón, guinda y tumbo costeño. Sin embargo son menores al Camu-camu y tumbo serrano.

La concentración de Fenoles Totales en los alimentos como el pito y granolas, están presentados en la tabla 24.

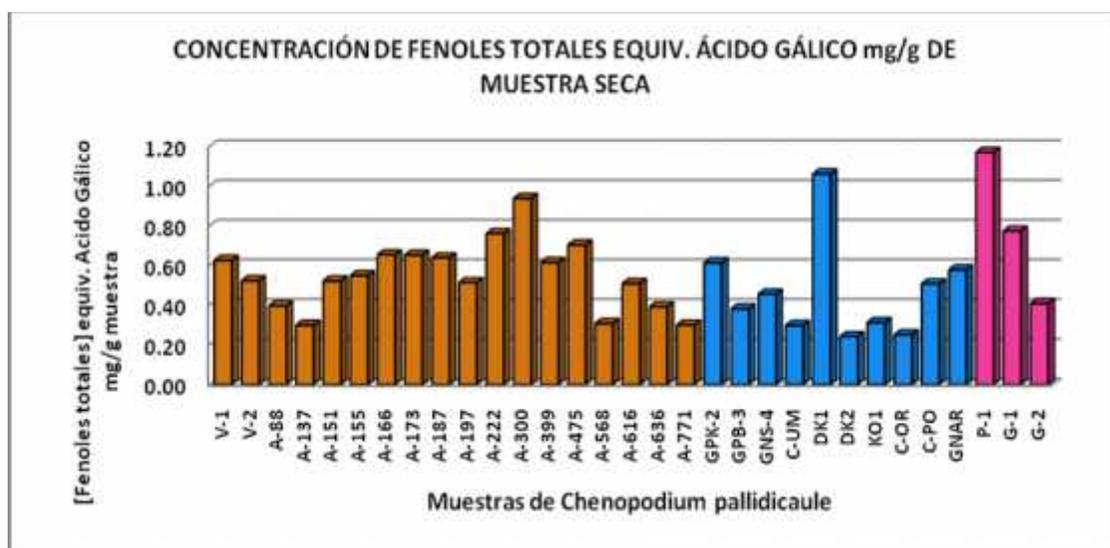
**Tabla 24.** Concentración de Fenoles totales en muestras comerciales

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Producto Alimenticio</b>	<b>FENOLES TOTALES</b>
<b>1</b>	P-1	Pito	1.17
<b>2</b>	G-1	Granola 1	0.77
<b>3</b>	G-2	Granola 2	0.41

De acuerdo al trabajo realizado por Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>, el uso de la temperatura en el horneado de las muestras estudiadas tuvo un impacto negativo sobre el valor de Capacidad Antioxidante bajando los valores iniciales,

porque la temperatura de horneado utilizada en la investigación fue de 200°C a 250°C por 20 minutos. De ello se puede sugerir que nuestros alimentos pudieron tener mayores valores cuando eran granos sin ningún proceso. Aunque las condiciones para el proceso de tostado de granos de cañihua (pito) o su expansión (granola) no son tan agresivos porque emplean temperatura cercana a 120°C y el tiempo empleado es mucho menor a los 20 minutos.<sup>40</sup> Pese a ello, la muestra de pito exhibe valores muy significativos de Capacidad Antioxidante, mayor a las muestras de granola.

En relación al conjunto de muestras, la que mayor valor exhibe, es la P-1, detalle que puede verse en la figura 38, junto a las muestras A-300 y DK1.

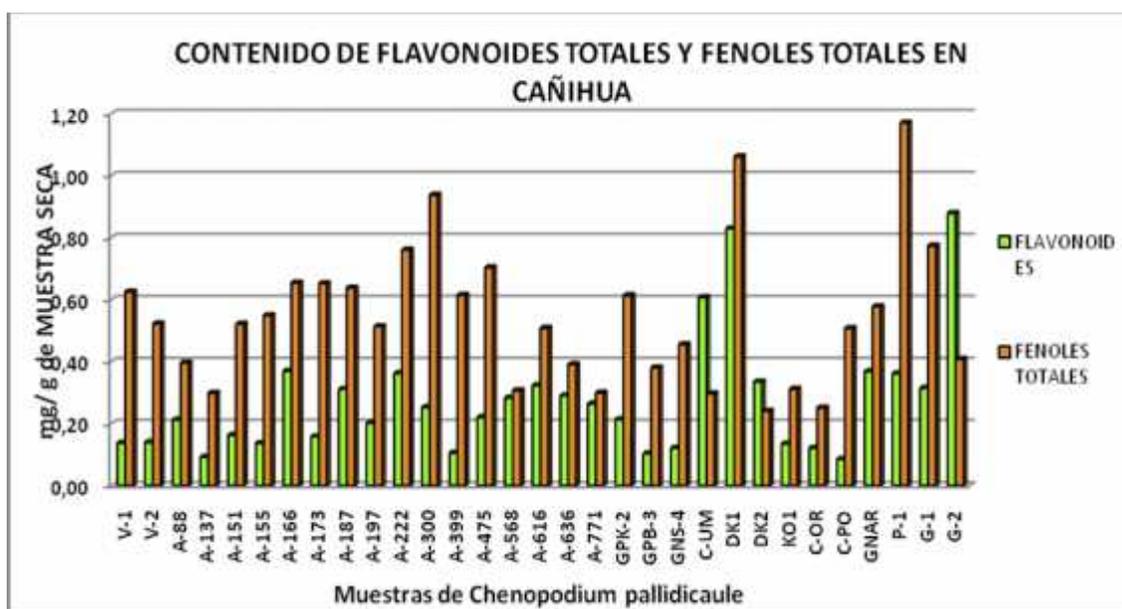


**Figura 38.** Concentración de Fenoles totales expresado en GAE mg/g de Muestra Seca

Podemos concluir que existe diferencia de concentración entre todas las muestras de cañihua. Además la concentración de fenoles totales explica muy bien el comportamiento que tuvo este metabolito como responsable de reacción en los ensayos de Actividad Antioxidante medidos por ABTS, DPPH y FRAP.

Teniendo como muestra muy representativa a DK1, P-1 y A-300 con niveles altos de Fenoles Totales.

Realizada una revisión y globalización de las concentraciones de los compuestos fenólicos y flavonoides, presentamos en la figura 39, diferencias entre ambos en las diferentes muestras. Expresados ambos ensayos en mg/ g de muestra seca, en equivalentes de CAE y GAE respectivamente. Donde las primeras 18 corresponden a las cultivadas por PROINPA, las 10 restantes a muestras silvestres y las últimas 3 son los alimentos que se analizaron.



**Figura 39.** Contenido de Flavonoides Totales y Fenoles totales en cañihua

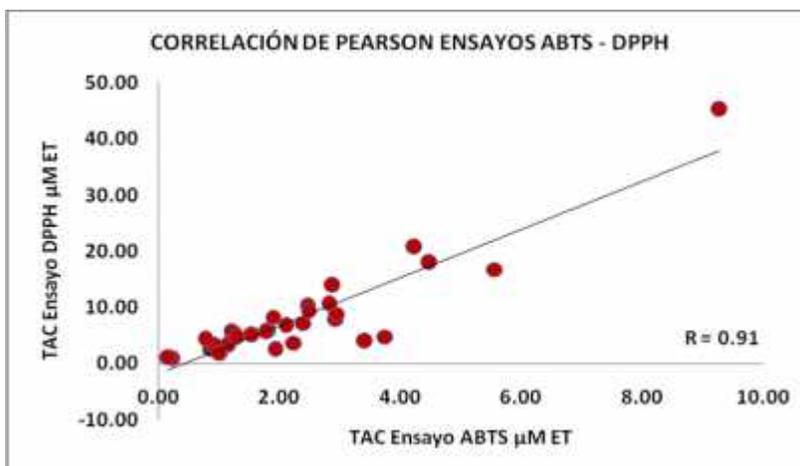
El contenido total de fenoles estuvo entre el 2 y 5 veces más que el contenido de flavonoides en todas las muestras, excepto las muestras C-UM, DK2 y G-2EI. Los compuestos fenólicos, como metabolitos secundarios son ubicuos en los vegetales, frutas y granos de cereales como la cañihua. Según la figura se entiende que la capacidad antioxidante total (TAC) obtenida por los diferentes ensayos fue debida a la acción de los compuestos fenólicos y flavonoides.

Esta aseveración se apoya en La investigación realizada por Zavala-Nigoa et al<sup>124</sup> en extractos de *Lippia graveolens*, donde la composición de fenoles era mayor a la de flavonoides, por ejemplo de 231.56±2.50 mg GAE/g extracto liofilizado a 163.75±1.40 mg CE/g extracto liofilizado.

Por otro lado, el hecho de que la concentración de flavonoides sea mayor al de compuestos fenólicos, como se observa en la muestra C-UM, DK2 y G-2EI está corroborado por otra investigación publicada por Muñoz et al (2007)<sup>123</sup> que en análisis de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas, se encontró que la muestra codificada como 1, presentó 0.0283 mg/g miel y de flavonoides 0.0458 mg/g miel y las muestras 4 y 5, que no se determinó su valor en compuestos fenólicos, poseían flavonoides con un valor de 0.0552 y 0.0731 mg/ g de miel. Cabe aclarar que los fenólicos están expresados en GAE y los compuestos flavonólicos en Equivalente de Quercetina.

#### **4.2. Correlación lineal de los diferentes ensayos realizados**

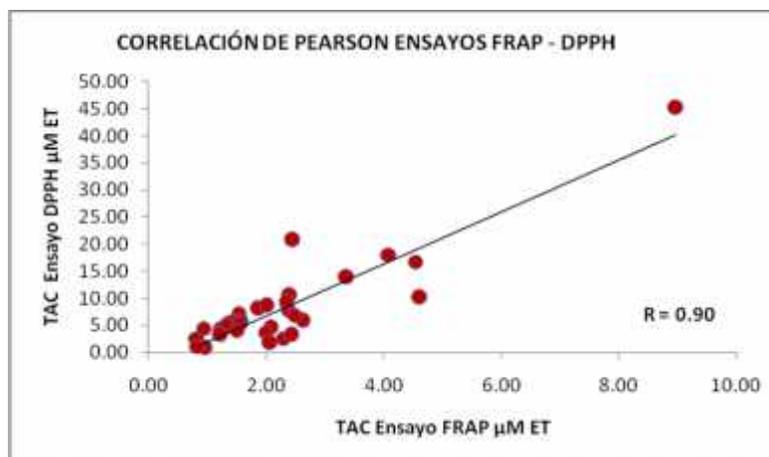
Realizada la correlación entre los ensayos, se encontraron valores de R: ABTS-DPPH= 0.91, FRAP-DPPH= 0.90 y ABTS-FRAP =0.87. Todos presentaron un valor positivo lo cual indica que existe correlación significativa entre los diferentes ensayos realizados en los granos de cañihua. Esto se debe al hecho de que la química detrás de estos ensayos se basa en los mismos principios de propiedades de óxido-reducción, otorgando una alta correlación entre los valores determinados. Esto es apoyado por investigaciones citadas por Alvarez-Jubete et al<sup>114</sup>. Las figuras 40, 41 y 42 son las gráficas obtenidas con las correlaciones obtenidas.



**Figura 40.** Correlación de ensayo ABTS con DPPH. Fuente: Elaboración propia

Significa que la Capacidad Antioxidante medida por los ensayos de inhibición de ABTS y DPPH guarda una relación estrecha de reacción, donde el antioxidante de la cañihua es la misma estructura química, que reaccionó inhibiendo de la misma manera al sustrato.

En la correlación de FRAP y DPPH, se observa un comportamiento similar al anterior con un valor muy cercano de 0.90.

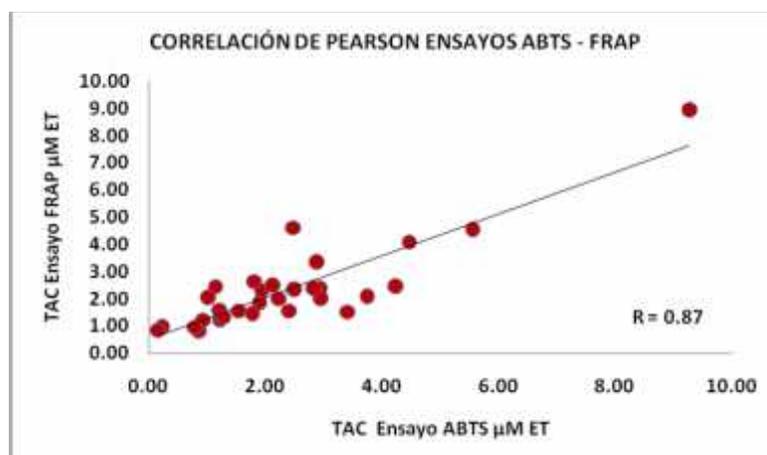


**Figura 41.** Correlación de ensayo FRAP y DPPH. Fuente: Elaboración propia

Esto podría significar que tanto la inhibición por parte de antioxidante de la cañihua sobre el sustrato oxidante y la capacidad de reducción del hierro por parte del mismo antioxidante han sido eficaces en su reacción.

Tomando en cuenta otras fuentes, se han comparado nuestras correlaciones con las siguientes presentadas por el investigador Peng et al<sup>125</sup>, desarrollado en el análisis de extractos acuosos de 25 plantas en el país de Singapur. La correlación determinada entre DPPH-FRAP fue igual a 0.94953 que explica el concepto básico de los antioxidantes como agentes reductores. Los antioxidantes son compuestos capaces de donar un electrón simple o átomo de hidrogeno para la reducción. Sin embargo, no todos los agentes reductores son antioxidantes. En el presente estudio la correlación entre los valores de DPPH y FRAP igual a 0.90, indica que los compuestos presentes en los extractos de cañihua son capaces de reducir el radical DPPH y a la vez son capaces de reducir los iones férricos del ensayo FRAP. El ensayo FRAP sugiere que la habilidad reductora de los poli fenoles parece ser un importante factor dictado o dirigido por un radical libre con capacidad secuestrante de los compuestos, esto también fue citado por Saura-Calixto.

En cuanto a la correlación de los ensayos ABTS y FRAP, esta es significativamente importante porque ambos poseen diferentes principios de reacción diferentes. La figura 42 muestra tal correlación.



**Figura 42.** Correlación de ensayo ABTS con FRAP. Fuente: Elaboración propia

Comparando con la correlación de Peñarrieta et al, en la relación ABTS-FRAP, obtuvieron: 0.77 a 0.86 en extracto soluble e insoluble, mientras que en el presente trabajo se calculó un valor de 0.87, valor muy próximo, tomando en cuenta que las muestras de cañihua fueron diferentes a las estudiadas por el investigador citado, aunque empleó la misma matriz alimenticia. Presentamos en la tabla 25 los R obtenidos en el presente estudio y los R determinados en la investigación de Peñarrieta et al.

**Tabla 25.** Correlación de ensayos: a) R obtenidos\* b) Peñarrieta et al\*\*

CORRELACION ENTRE ENSAYOS	VALOR R*	VALOR R (Peñarrieta et al)**
<b>ABTS Y FRAP</b>	0.87	0.77-0.86
<b>ABTS Y DPPH</b>	0.91	
ABTS Y FLAV	0.66	0.11-0.76
ABTS Y FENOLES	0.74	0.41-0.59
<b>FRAP Y DPPH</b>	0.90	
FRAP Y FLAVONOIDES	0.54	0.74-0.82
FRAP Y FENOLES	0.59	0.28-0.70
DPPH Y FLAVONOIDES	0.52	
DPPH Y FENOLES	0.69	
FENOLES Y FLAVON	0.25	0.65-0.77

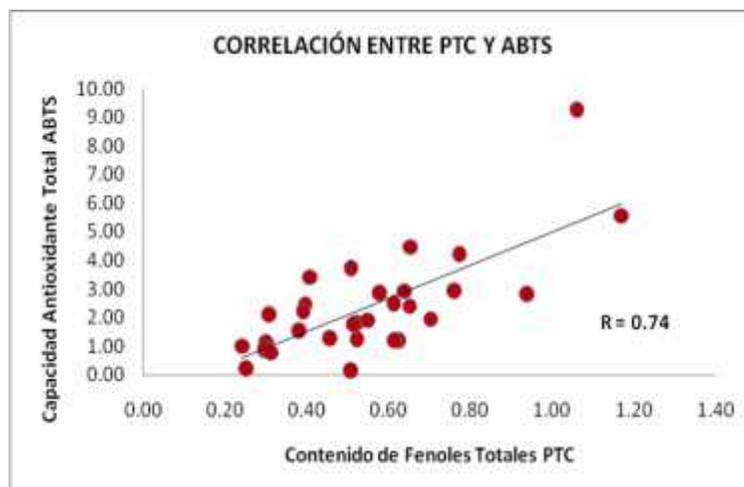
Fuente: Elaboración propia

En la primera correlación de ABTS y FRAP, nuestro valor es mayor por una centésima, sin embargo se encuentra cerca del mismo rango. En la correlación ABTS y Flavonoides se observa que nuestro R, se encuentra en el rango que publicó el autor. Entre ABTS y Fenoles totales, nuestro R fue mayor al valor máximo del rango de Peñarrieta et al.<sup>16</sup>

Realizada la comparación entre FRAP y Flavonoides, nuestro R es menor al rango determinado por el anterior autor de 0.54 a 0.74. Obtenidos los valores, comparamos entre FRAP y Fenoles totales, nuestro valor se encuentra en el rango determinado por el investigador citado. Estas repeticiones o aproximaciones de valores explican que tanto los ensayos fueron desarrollados de la misma manera metodológica, además de que la muestra era cañihua, aunque de diferentes variedades.

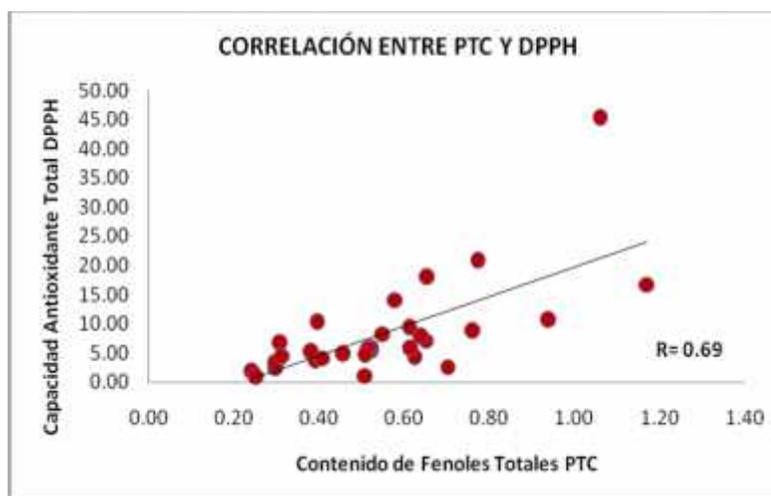
La correlación entre el Contenido de Fenoles totales (Total Phenolic Compounds) y Capacidad antioxidante se apoya en las siguientes relaciones. Empleando las 31 muestras de cañihua, tenemos que:

- PTC-ABTS fue de 0.74, valor muy significativo que indica la contribución adecuada de compuestos fenólicos a la capacidad antioxidante medida por la inhibición del catión ABTS, la misma se observa en la figura siguiente. Este valor nos permite indicar que el ensayo ABTS es la más adecuada para determinar Capacidad Antioxidante Total dada por compuestos polifenólicos en cañihua.



**Figura 43.** Correlación de PTC con ABTS. Fuente: Elaboración propia

- PTC-DPPH fue de 0.69, correlación significativa donde los compuestos fenólicos fueron responsables de la inhibición al oxidante DPPH



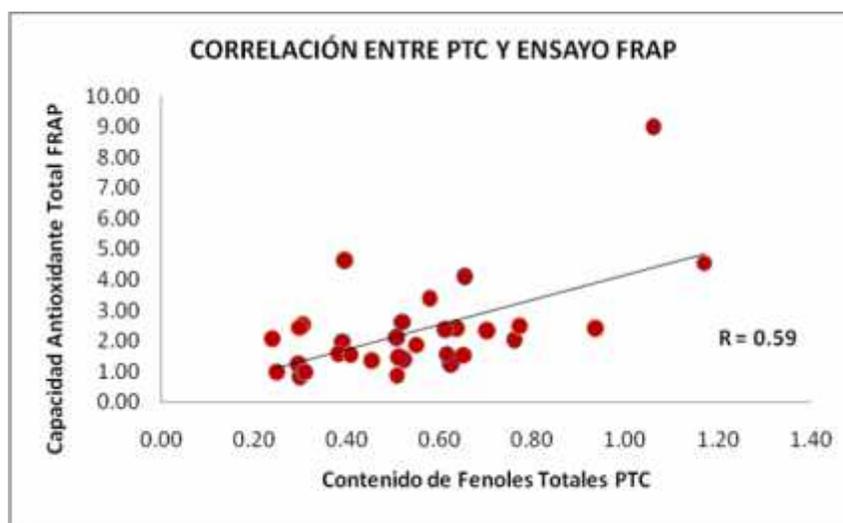
**Figura 44.** Correlación de PTC con DPPH

Fuente: Elaboración propia

De igual manera al anterior, éste ensayo es el segundo importante para la medición de Capacidad Antioxidante Total porque el valor es aproximadamente de 0.70, redondeando de 0.69. Tanto la anterior correlación y ésta basan su resultado en el mismo tipo de reacción de

inhibición, sin embargo esta es de efecto cinético con variables a controlar importantes como el tiempo de reacción, temperatura del reactivo, variables que explican el R encontrado. Estas variables se han estudiado y publicado en las investigaciones de Pérez-Jiménez y Saura-Calixto. En la investigación de Peng<sup>125</sup> et al, se determinó la correlación entre TPC y DPPH, cuyo valor fue de 0.56562. Realizando la respectiva comparación encontramos un mejor valor de correlación del efecto antioxidante de los fenoles totales en el ensayo DPPH porque nuestro valor fue de 0.69.

- PTC-FRAP fue de 0.59, significativa, aunque el valor numérico es menor a los anteriores, tal como podemos observar en la figura 45. Sin embargo es una correlación significativa.



**Figura 45.** Correlación de PTC con FRAP. Fuente: Elaboración propia

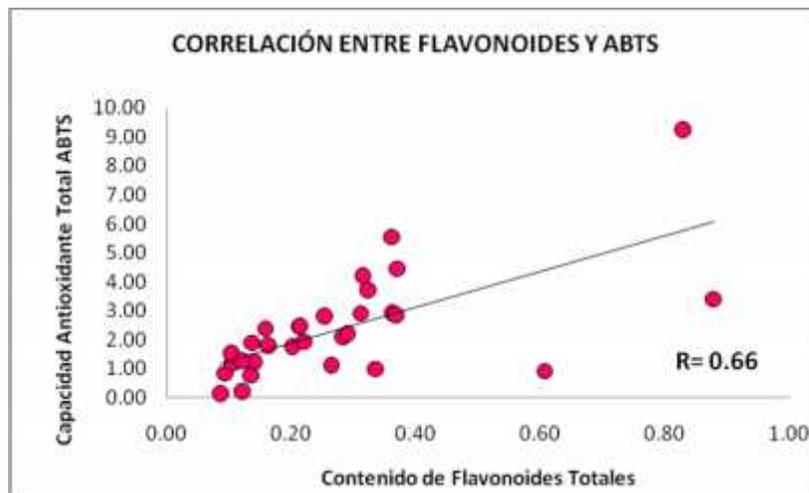
Contrastando con la investigación realizada por Garcia, J et al<sup>126</sup>, ellos encontraron un  $R=0.56$  para muestras de duraznos, pero empleando la misma metodología. Esta similitud en resultados permite garantizar los ensayos empleados para las muestras de cañihua, teniendo

en cuenta que fueron diferentes alimentos, desarrollados en diferentes espacios geográficos.

En la investigación realizada por Peng et al<sup>125</sup>, se obtuvo un  $R= 0.54803$  entre TPC-FRAP, el presente trabajo determinó un valor de 0.59, que indica que los fenoles totales en las muestras de cañihua reaccionaron mejor en la reducción de los iones férrico del reactivo FRAP en comparación a las 25 especies de vegetales del país asiático, Singapur.

La correlación entre el Contenido de Flavonoides totales y Capacidad antioxidante, basado en la reacción de 31 muestras de cañihua, presenta las siguientes características.

- Flavonoides y ABTS tuvo un  $R$  de 0.66 presentada en la figura 46. Se observa un mismo patrón de respuesta con las próximas correlaciones.



**Figura 46.** Correlación de Flavonoides y ABTS

Fuente: Elaboración propia

- Flavonoides y DPPH tuvo un  $R$  de 0.52. La figura 47 presenta la correlación indicada. De acuerdo a la publicación de Silva et al<sup>6</sup>, los

efectos de secuestro de los flavonoides en el ensayo DPPH tienen su fundamento en la presencia del anillo B, la presencia de orto-catecol es el más importante para la actividad antioxidante además de la presencia de un enlace doble 2,3 y un OH en la posición 3 es fundamental para este mismo efecto.

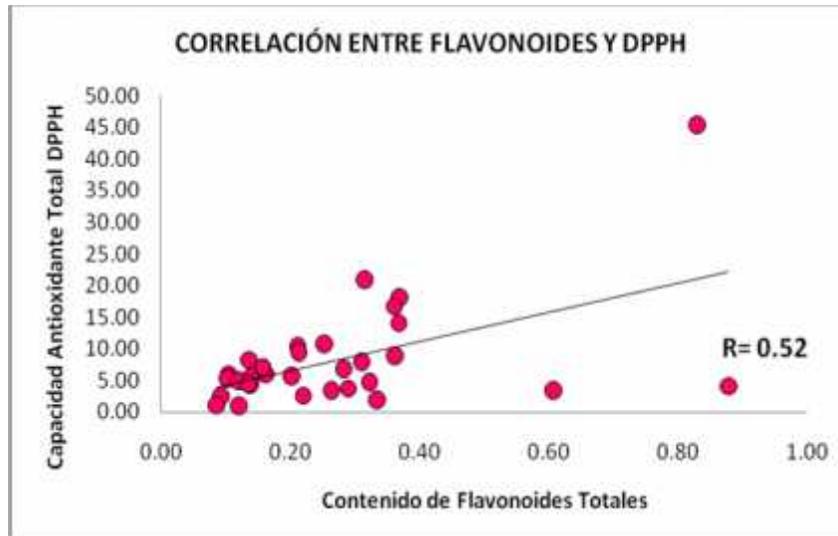


Figura 47. Correlación de Flavonoides y ensayo DPPH. Fuente: Elaboracion propia

- Flavonoides y FRAP tuvo un R de 0.54, presentada en la figura 48.

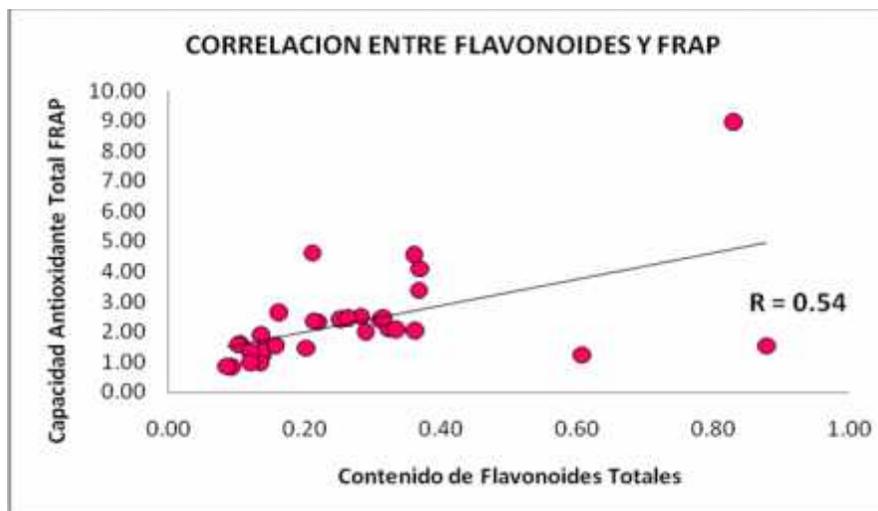
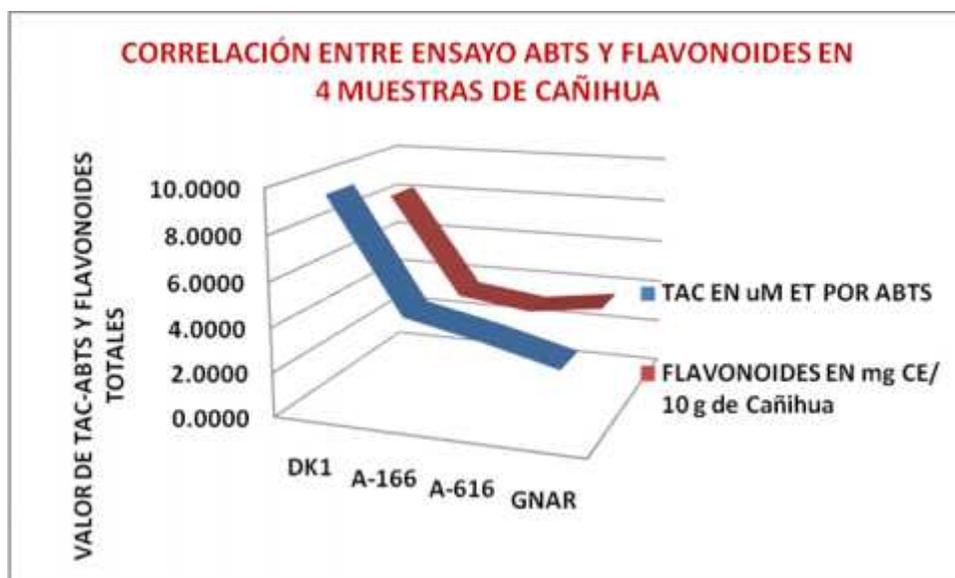


Figura 48. Correlación de Flavonoides y ensayo FRAP. Fuente: Elaboración propia

Los análisis de correlación entre el contenido de flavonoides con la Capacidad antioxidante son significativas y probablemente se explica porque los diversos

compuestos muestran gran variabilidad en sus actividades antioxidantes. De los 3 ensayos de TAC empleados se vuelve a confirmar que el ensayo más óptimo para medir TAC en granos de *Chenopodium pallidicaule* es el ABTS.

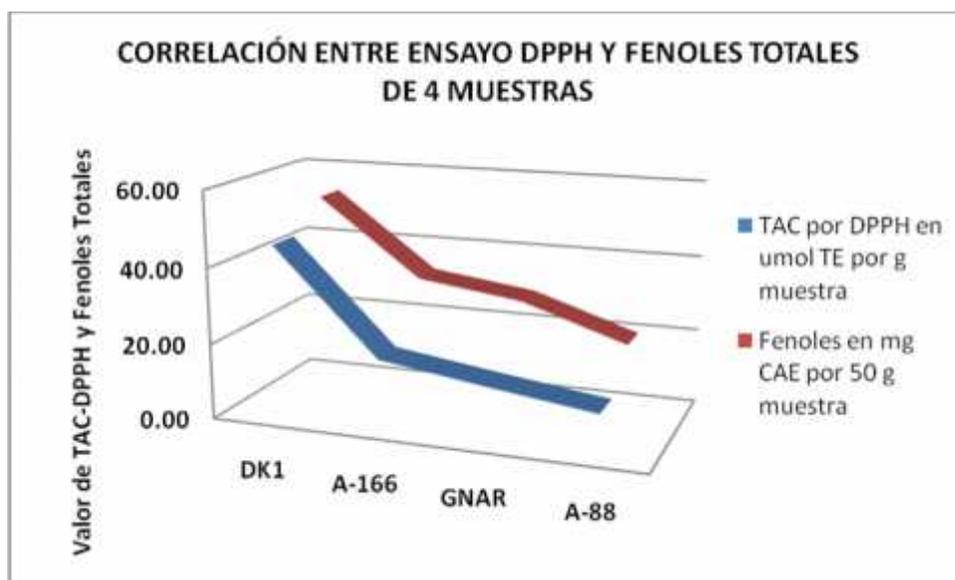
Por otro lado, graficando muestras con valor más alto de capacidad antioxidante realizamos una correlación entre el contenido de Flavonoides totales y el ensayo ABTS, el comportamiento observado es de correlación significativa. La siguiente gráfica toma cuatro muestras que reportaron para este método valores de hasta 9.28 ET $\mu$ M/g muestra, con el fin de compararlas se ajustó la concentración de Flavonoides referido a 10 g muestra de cañihua y se mantuvo el valor de ABTS obtenido. Ver figura 49:



**Figura 49.** Correlación de 4 muestras de flavonoides con ABTS. Fuente: Elaboración propia

Entendiendo por esto que el conjunto de flavonoides, constituido por un gran número de estructuras que tienen en común el anillo del catión flavilio, como ser: antocianinas, flavonas, flavanonas, etc., son responsables de la Capacidad Antioxidante total que mide el ensayo ABTS.

Por otro lado también se observa que la correlación entre el ensayo DPPH y Fenoles totales para las muestras con valor más alto, exhibe una tendencia similar de correlación, la que se puede ver en la figura 50. Cabe aclarar que para una mejor comprensión de ambos resultados se refirió la concentración de Fenoles a 50 g de muestra, mientras que el DPPH se mantuvo en su valor original.



**Figura 50.** Correlación PTC vs TAC (DPPH) de 4 muestras de cañihua.

Fuente: Elaboración propia

En cuanto a los resultados de los productos alimenticios, conocidos como granolas, se encuentra ciertas diferencias en sus valores de TAC y la concentración de metabolitos. En principio tomando en cuenta la calidad de los ingredientes empleados en su elaboración se pensaría contar con alimentos funcionalmente completo y con valor antioxidante alto, sin embargo el resultado no fue el esperado. Existen diferencias entre ambas granolas, hecho que permite inferir que realizar una combinación de ingredientes vegetales nutricional y funcionalmente importantes no garantiza un sinergismo entre ellos, podría existir un antagonismo entre los compuestos químicos que se genera en

la elaboración, además el enmascaramiento de fracciones importantes para el análisis de TAC. Todo esto ocasionaría valores bajos del mismo o mayor tiempo de reacción e inclusive otra forma de tratamiento de la muestra. También sería importante estudiar las relaciones y proporciones de ingredientes naturales que exhiben mejores valores TAC y mejor valor nutricional.

Realizando la valoración y resumen final de los resultados, indicamos valores de TAC mínimo y máximo expresados en  $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra seca que se indica en la tabla 26.

**Tabla 26.** Rango de mínimos y máximos de TAC obtenido por los ensayos.

Ensayo	Valor mínimo TAC		Valor máximo TAC		Rango
	Valor	Código	Valor	Código	
<b>ABTS</b>	0.15	C-PO	9.28	DK1	0.15-9.28
<b>FRAP</b>	0.83	A-137	8.90	DK1	0.83-8.90
<b>DPPH</b>	0.95	C-OR	45.38	DK1	0.95-45.38

Fuente: Elaboración propia.

Los valores máximos corresponden a una misma muestra. Los valores mínimos corresponden a muestras que a lo largo de los análisis exhibieron los valores bajos. En la siguiente tabla (27) observamos los valores mínimos y máximos de la cuantificación de Fenoles totales TPC y Flavonoides FT.

**Tabla 27.** Rango de valores mínimos y máximos de TPC y FT. Valores de Fenoles totales en  $\text{mg EG/g}$  de muestra seca y los de Flavonoides totales en  $\text{mg EC/g}$  de muestra seca.

Ensayo	Valor mínimo	Valor máximo	Rango
--------	--------------	--------------	-------

	<b>Valor</b>	<b>Código</b>	<b>Valor</b>	<b>Código</b>	
<b>Fenoles totales</b>	0.16	DK2	0.69	DK1	0.16-0.69
<b>Flavonoides totales</b>	0.09	A-137	0.83	DK1	0.09-0.83

Fuente: Elaboración propia.

Los valores máximos son de la muestra DK1 En cuanto al valor mínimo son dos muestras: una accesión (137) y una muestra silvestre (DK2) que reportan concentraciones mínimas.

## V. CONCLUSIONES

En relación a la pregunta de investigación el presente trabajo ha logrado su objetivo pues se ha logrado determinar que efectivamente, en el conjunto de muestras y accesiones de *Chenopodium pallidicaule* sp procesadas en el presente trabajo se ha encontrado un rango de valores de Capacidad Antioxidante Total de las muestras que en relación a datos consignados en la literatura de vegetales semejantes a la cañihua reportan datos que valorizan a este cultivo por su TAC y dan pie para que en el futuro se puedan establecer reclamaciones fundamentadas de salud.

De acuerdo a los objetivos y resultados presentados en esta tesis de investigación en Química de Alimentos, se concluye:

1. Todas las muestras exhibieron Capacidad Antioxidante, expresada en los resultados mediante los ensayos: ABTS, DPPH y FRAP. Las muestras del Banco de Germoplasma tuvieron un comportamiento muy homogéneo, solo 4 accesiones descollaron por sus valores altos, la accesión 166 (grano color mostaza), y la accesión 616 (grano color beige uniforme) en la mayoría de las pruebas y las accesiones 088 (grano color naranja) y 300 (grano mostaza-naranja) en algunos ensayos. Los valores mínimos y máximos para este grupo de muestras y ensayos fueron: ABTS= 0.86 - 4.47  $\mu\text{mol TE/ g}$  que corresponden a las muestras A-137 y A-166 respectivamente. En el ensayo de inhibición DPPH= 2.54 – 10.71  $\mu\text{mol TE/ g}$  que responden a las muestras A-137 y A-300. En el análisis FRAP=0.81 – 4.61  $\mu\text{mol TE/ g}$  en las muestras A-137 y A-88 respectivamente

Los granos colectados en la región altiplánica de nuestro país, presentaron valores heterogéneos, desde 0.15 - 9.28  $\mu\text{mol TE/ g}$  según ABTS que corresponden a C-PO y DK1 respectivamente. En el ensayo DPPH: C-OR y DK1 corresponden a 0.95 - 45.38  $\mu\text{mol TE/ g}$  de muestra

seca. Las muestras C-PO y DK1 también fueron las con valor mínimo y máximo: 0.84 - 8.96  $\mu\text{mol TE/g}$  en el ensayo FRAP.

Los granos de *Chenopodium pallidicaule*, propio de nuestro ecosistema, sea como variedades nuevas, accesiones en estudio, muestras silvestres colectadas a lo largo del altiplano y valle bolivianos, por sus componentes determinados exhibe una actividad significativa en el secuestro de radicales libres por la inhibición producida, características químicas que la convierten en un alimento funcional antioxidante, útil en la prevención de enfermedades propias de nuestra sociedad y época. La Capacidad Antioxidante de los granos de *Chenopodium pallidicaule*, son superiores a algunas frutas como los mango, la piña y vegetales como las zanahorias, papas y cebollas.

2. Se cuantificó la concentración de Fenoles totales, compuestos responsables de la Capacidad Antioxidante Total, determinándose valores desde 0.19 – 0.61 de las muestras A-771 y A-300 en las muestras de PROINPA. El rango entre las muestras silvestres fue 0.16 a 0.69 mg GAE/g de muestras que corresponden a los códigos C-OR y DK1.
3. Se obtuvieron valores de Flavonoides totales cuyo rango fue 0.09 a 0.83 mg CAE/g de muestra de cañihua por el Método de Zhishen, que fue modificado en su parte operativa en el presente trabajo para la obtención de mejores resultados.

De todo el universo muestral, el grano de cañihua muestreado en la región de Challapata (Depto. Oruro) con código DK1 y con coloración marrón oscura, considerado grano silvestre, posee los valores más altos de Actividad Antioxidante Total expresados en  $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra. Su concentración de fenoles totales y flavonoides totales muestra correlación con tales valores.

Los productos alimenticios, pito y granolas, dieron valores de TAC altos en relación al conjunto de datos que justifican el impulso que debe darse a su empleo. De forma especial debe citarse el pito de cañihua, cuyo manejo tecnológico no parece afectar la presencia de actividad antioxidante, que se evidenció por los valores de TAC y los metabolitos fenoles y flavonoides que presenta concentraciones significativas en relación al conjunto.

La agregación o mezcla —que no era objeto del presente estudio— de diversos ingredientes naturales como quinua, cañihua, amaranto y miel con un alto contenido de antocianinas y otros compuestos fenólicos, etc., en productos alimenticios con cañihua puede afectar —aumentar o disminuir, en este caso incrementar— los valores de la capacidad antioxidante total, como se observó a lo largo del análisis.

4. El color de los granos es importante, aunque no totalmente concluyente, en el valor de Capacidad Antioxidante porque las muestras con valores inferiores de TAC, poseen un color de grano blancuzco, pálido, beige. Los granos de colores como naranjas o amarillos muestran valores significativamente altos. Es importante notar que la muestra de Umala (La Paz, prov. Aroma) grano oscuro, gris y negro brillante tuvo una concentración de Flavonoides notoriamente alta que se expresó en el ensayo FRAP.
5. De acuerdo a los valores de correlación entre los ensayos que miden la actividad antioxidante cuyos valores fueron de 0.87 entre ABTS y FRAP, 0.90 entre DPPH y FRAP y 0.91 entre ABTS y DPPH, se observa que el ensayo que mide con más precisión es el ensayo ABTS y comparando entre los ensayos de inhibición (ABTS y DPPH) y de reducción (FRAP), los primeros son más eficaces en este tipo de matriz de *Chenopodium pallidicaule*.

Por otro lado, las correlaciones entre los compuestos flavonoides y fenoles frente a los ensayos de Capacidad Antioxidante presentaron un rango menor a los anteriores, desde 0.52 – 0.69, ésta última pertenece a la correlación entre Fenoles totales y DPPH, que explicaría que la reacción de inhibición de los fenoles frente al reactivo fue la que determinó la absorbancia y los niveles encontrados.

Las repeticiones en las lecturas espectrofotométricas tuvieron un coeficiente de variación significativo ya que en el ensayo ABTS fue menor a 10%, en el ensayo DPPH menor a 5%, en el ensayo FRAP todas tienen un CV menor a 5%, excepto una muestra. El coeficiente de variación en un conjunto de datos expresa que los resultados de las pruebas repetitivas son confiables. En la cuantificación de Flavonoides, todas menos cuatro muestras tuvieron un coeficiente de variación menor a 5%. Los Fenoles totales fueron una de las pruebas con menor variabilidad entre las repeticiones porque se encontró hasta un coeficiente de variación de 0.8% y como valor más alto de 4,8%, valores que califican óptimamente las reacciones, lecturas espectrofotométricas realizadas.

El análisis de varianza de los datos de cada ensayo, reveló que las diferencias entre las 31 muestras es significativa en relación a su Capacidad Antioxidante.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda el consumo de granos de cañihua, quenopodiácea importante, porque su calidad nutricional es completa y se complementa con su calidad de alimento funcional antioxidante. A la vez que compite su valor con frutas de mayores dimensiones.

Se recomienda tomar en cuenta los resultados de los granos de color del Banco de Germoplasma para un nuevo diseño de producción de accesiones en diferentes suelos.

Se recomienda actualizar el ensayo de Flavonoides Totales tomando en cuenta la matriz alimenticia a analizar y el paso de centrifugación que es necesario en algunas situaciones para una mejor lectura de absorbancias de las soluciones de reacción.

Se recomienda a las empresas, entidades y grupos interesados al apoyo en la creación de políticas de producción, de transformación y consumo de este grano apoyando una mayor difusión cultural culinaria de los usos de este grano no exigente y versátil en la elaboración de diferentes tipos de alimento.

Se recomienda a las comunidades, poblaciones y municipios en los que se cultiva cañihua, cuyos granos muestreados han dado un alto valor de TAC, que procedan a la recuperación, conservación y empleo de los mismos.

Uno de los factores que ha desalentado, en el pasado, el rescate del cultivo de la cañihua ha sido el pequeño tamaño del grano, lo que nos permite recomendar a los ministerios, municipios e instituciones involucradas apoyar los esfuerzos de mejoramiento genético a fin de obtener variedades con plantas más altas y con granos más grandes que faciliten su cultivo sin alterar su valor nutricional ni la Capacidad Antioxidante determinada.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Woods A., Eyzaguirre P. (2004). La cañahua merece regresar. Revista de Agroecología LEISA. N° 1 Vol. 20:16-18
2. Salas S. (1998). Avances en la investigación en posproducción de alimentos andinos en el marco de Condesan, consorcio para el desarrollo sostenible de la eco región andina, Centro internacional de la papa.
3. Delgado R. (1996). Proyecto R5-002: Consumo y Mercadeo de Tubérculos Andinos, cit. en Salas Domínguez.
4. Tiwari A. (2001). Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. Current Science 81(9): 1179-1187.
5. Mimic-Oka J, Simic D, Simic T (1999) Free Radicals in cardiovascular diseases. The Scientific Journal FACTA UNIVERSITATIS: Medicine and Biology 6(1): 11 – 22.
6. Silva M, Santos M, Caroço G, Rocha R, Justino G, Mira L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. Free Radical Research 36(11): 1219–1227.
7. Romero A, Doval M, Sturla M, Judis M. (2003). Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas.

8. Torel J, Cillard J, Cillard P. (1996). Actividad antioxidante de los flavonoides y reactividad con el radical peróxido. *Revista Fitoquímica* 25(2): 383 – 385
9. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal Clinical Nutrition* 81 (suppl): 268-276.
10. Repo R, Encina C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 74(2): 85-89.
11. Repo-Carrasco R, Acevedo de La Cruz A, Icochea J, Kallio H. (2009). Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) Grain, Extrudate and Bran. *Plant Foods Human Nutrition*: 1-8. doi 10.1007/s11130-009-0109-0
12. Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O, Dini A. (1995). Studies on the Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) Seeds. Isolation and Characterization of Two New Flavonol Glycosides. *Journal Agricultural Food Chemical* 43: 2020-2024.
13. Rastrelli L, De Simone F, Schettino O, Dini A. (1996). Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) Seeds: isolation and characterization of new triterpene Saponins. *J. Agric. Food Chem.* 44(11): 3528-3533
14. Rastrelli L, De Tommasi N, Ramos I. (1996). Ecdysteroids in *Chenopodium pallidicaule* Seeds. *Biochemical Systematics and Ecology* 24(4): 353.

15. Peñarrieta J.M, Alvarado JA, Akesson B y Bergenstahl B. (2005). Total Antioxidant Capacity in Andean Food Species from Bolivia. *Rev. Bol. Quim.* 22: 89-93
16. Peñarrieta M, Alvarado J, Akesson B, Bergenståhl B. (2008). Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in cañihua (*Chenopodium pallidicaule*): An Andean pseudocereal. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 708-717. doi 10.1002/mnfr.200700189
17. Girault Louis. (1966). Classification vernaculaire des plantes medicinales chez les callawaya, medecin empiriques, Bolivie. *Journal de la Societe des Americanistes, Paris* 55 (1): 155-200.
18. Mujica A. (1977). Granos y leguminosas andinas: Cultivo de la quinua en la Agricultura Andina. Serie FAO: cap 3.
19. Blanco T, Alvarado-Ortiz U, Muñoz C, Jauregui A. (Sin año). Evaluación de la composición nutricional de la maca y cañihua, procedente de diversos departamentos del Perú.1 (3):1-11
20. Repo-Carrasco R, Espinoza C, Jacobsen S-E. (Sin año). Valor Nutricional y Usos de la Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y de la Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) Cultivos Andinos FAO.
21. Cahuana F L. (1975). Comparativo de rendimiento de cinco formas botánicas de cañihua por tres distanciamientos entre surcos. En: Mujica A, Jacobsen S, Ortiz R, Canahua A, Apaza V, Aguilar P, Dupeyrato R. (2002) Investigaciones en cañihua. Instituto de Investigación U.N.A. Perú

22. Repo-Carrasco R, Hoyos L. (1993). Elaboración y evaluación de alimentos infantiles con base en cultivos andinos. Arch. Latinoamer. Nutr. 43: 168-175
23. Cortés H, Johnston P. (2007). Evaluación de cuatro niveles de polvillo de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*, A.) en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus* L) en crecimiento. RELAN III (1): 12-16
24. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26: 1231-1237
25. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-filho J, Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc Tecnol. Aliment. 25 (4): 726 - 732
26. Apak R, Guclu K, Demirata B, Oxyurek M, Esin S. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules 12: 1496-1547.
27. Lacalle A. (2007). Antioxidantes en la alimentación: Tipos de unidades y métodos de Análisis. (Presentación en ppt)
28. Acevedo B, Montiel M, Avanza J. (Sin año). Efecto del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante total de jugos de pomelo, naranja y mandarina. Laboratorio de Tecnología Química – Argentina
29. Amarowicz R, Zegarska Z, Pegg R, Karamac M, Kosinska A. (2007). Antioxidant and radical scavenging activities of a barley crude extract and its fraction. Czech Journal Food Science 25(2):73-80

30. Vangdal E, Slimestad R. (2006). Methods to determine antioxidative capacity in fruit. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14(2): 123-131
31. Arts M, Sebastiaan J, Voss H, Haenen G, Bast A. (2003). A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry* 80: 409-414
32. Arts M, Haenen G, Voss H, Bast A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology* 42: 45-49
33. Bouysse-Cassagne, Therese. (1991). VII.1 Poblaciones humanas antiguas y actuales., 112 *Archeo* 02
34. Browman, David L. (1983). Aspectos de Nutrición Prehistórica en la Cuenca del Lago Titicaca. *Revista "Diálogo Andino"* No 2 – 1983, Departamento de Historia y Geografía, Universidad de Tarapacá, Arica-Chile
35. Moragas W., Cora, Adán L, Agüero C, Vilches F. (2007). El complejo Pica-Tarapacá, propuestas para una arqueología de las sociedades de los Andes Centro Sur. Universidad de Chile. Departamento de Antropología.
36. Villanueva J. (2011). *Formativo en la Cuenca del Titicaca, Altiplano Central y Valles*. Arica Chile. Programa de Postgrado en Antropología UCN-UTA
37. Kolata, Alan. (1977). La tecnología y Organización de la Producción Agrícola en el estado de Tihuanaku. En: *Arqueología de Lukurmata*: editores Proyecto Wilajawira. Universidad de Chicago – INAR. La Paz

38. Valdez, F. (2006). Agricultura Ancestral Camellones y Albarradas. Contexto social, usos y retos del pasado y del presente. 1° Edición.
39. National Research Council. (1989). Lost crops of the Incas: Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington, DC.
40. Rojas W, Soto JL, Pinto M, Jager M, Padulosi S. (2010). Granos Andinos Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. Biodiversity International. Fundación PROINPA.
41. Ayala, G. (1999). Raíces andinas. Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.12 páginas
42. Alencastre S. (1972). Digestibilidad In vitro (Primera etapa) de materia seca en granos de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) En: Investigaciones en Cañihua de la Universidad Altiplánica de Puno Perú, 2002 Care Perú-CINFO.
43. Monje Y, Raffailac JP. (2006). Determinación de Saponinas Total en Quinua (*Chenopodium quinua* Wild).Método Espectrofotométrico. Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal, 217 p.
44. Quiroga C, Escalera R. (2010). Evaluación de la Calidad Nutricional y Morfología del Grano de Variedades Amargas de Quinua Beneficiadas en Seco, Mediante el Novedoso Empleo de un Reactor de Lecho Fluidizado del Tipo Surtidor. Investigación & Desarrollo 10:23-36.

45. Pokorny J, Yanishlierva N, Gordon, M. (2001). Antioxidants in food. Practical Applications. Measuring antioxidant activity. Chapter 4. Woodhead Publishing Limited. Cambridge England). Part 2.

46.

[http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia/Vol29\\_N1\\_2003/temas.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia/Vol29_N1_2003/temas.htm)

Extraído en Octubre, 2009.

47. NASA. (1993). Quinoa. An Emerging “New” Crop with Potential for Controlled Ecological Life Support System (Cells), Technical Paper. 3422.

48. Scheldeman X, Rojas W, Valdivia R, Peralta E, Padulosi S. (sin año). Retos y Posibilidades del Uso de Especies Olvidadas y Subutilizadas en un Desarrollo Sostenible. IPGRI, PROINPA, CIRNMA, INIAP. Estación Experimental Santa Catalina, Quito, Ecuador International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Aleppo, Siria.

49. II Congreso Iberoamericano sobre Desarrollo y Medio Ambiente. CIDMA II Octubre 2005, 24-28. APuebla, México.

50. Zorrilla A. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. Vol 21(3):178-185

51. Sunny L. (2005). A Low Fat Diet Rich in Fruits and Vegetables May Reduce the Risk of Developing Prostate Cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Vol 6: 490-496

52. De la Rosa, Laura A, Álvarez-Parrilla, Emilio and González-Aguilar, Gustavo A. (2010). Fruit and Vegetables Phytochemicals. Chemistry, Nutritional Value and Stability. Ed. Wiley-Blackwell. (Grigelmo-Miguel et al, 2010).

53. Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T and Kominami R. (1991). Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Jpn J Cancer Res* 82(10):1061–1064
54. Botterweck AA, van den Brandt PA and Goldbohm RA. (1998). A prospective cohort study on vegetable and fruit consumption and stomach cancer risk in The Netherlands. *Am J Epidemiol* 148(9):842–853
55. Graham S, Dayal H, Swanson M, Mittelman A and Wilkinson G. (1978). Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 61:709–714.
56. Dosil-Díaz O, Ruano-Ravina A, Gestal-Otero JJ and Barros-Dios JM. (2008). Consumption of fruit and vegetables and risk of lung cancer: a case-control study in Galicia, Spain. *Nutrition* 24(5):407–413.
57. Nettleton JA, Steffen LM, Ni H, Liu K and Jacobs DR Jr. (2008). Dietary patterns and risk of incident type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care* 31(9):1777–1782.
58. Bazzano LA, Li TY, Joshipura KJ and Hu FB. (2008). Intake of fruit, vegetables, and fruit juices and risk of diabetes in women. *Diabetes Care* 31(7):1311–1317.
59. Pinent M, Blay M, Bladé MC, Salvadó MJ, Arola L and Ardévol A. (2004). Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines *Endocrinology* 145(11):4985–4990.

60. Burke J, Curran-Celentano J and Wenzel A. (2005). Diet and serum carotenoid concentrations affect macular pigment optical density in adults 45 years and older. *J Nutr* 135:1208–1214.
61. Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark D and Joseph J. (2006). Effect of Concord grape juice on cognitive motor deficits in aging. *Nutrition* 22:295–302.
62. William R, Spencer J and Rice-Evans C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signaling molecule? *Free Radic Biol Med* 36:838–849.
63. Lau F, Shukitt-Hale V and Joseph J. (2005). The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol Aging* 265:S128–S132.
64. Joseph J, Shukitt-Hale B, Casadesus G and Fisher D. (2005). Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochem Res* 30:927–935.
65. Joseph J, Arendash G, Gordon M, Diamond D, Shukitt-Hale B and Morgan D. (2003). Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr Neuroscience* 6:153–163.
66. Nuñez A. (sin año mayor a 2007). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidants: retos y oportunidades. Académico de Mérito. Academia de Ciencias de Cuba.
67. <http://ramanujan25449.blogspot.com/2012/04/el-veneno-que-respiramos.html>

68. Rice-Evans c, Miller N, Boliwell P, Bramley P, Pridham J.(1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoides. *Free Radical Research*. 22: 375-83
- 69 Li, C., Yue, W. Y Cheng, C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drugs Analysis* 11(4): 277-82.
70. Avalos A, Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.
71. Grotewold E. (2006). *The Science of Flavonoids*. Springe Science Business Media, Inc. USA.
72. Johannot L and Somerses SM. (2006). Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr* 9:1045–1054.
73. Mojziso´a G and Kuchta M. (2001). Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol Res* 50:529–535.
74. Luis DA, Aller R. (2008). Garlic and cardiovascular risk. *An. Med. Interna (Madrid)* 25:5.
75. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K and van Leeuwen PA. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74(4):418–425
76. Freedman JE, Parker C 3rd, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, lafrati MD and Folts JD. (2001). Select flavonoids and whole juice from purple

grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 103:2792–2798

77. Nagakawa K, Fujii S, Ohgi A, Uesato S. (2005). Antioxidant Activity of 3-O-Octanoil-(+)- Catechin, a Newly Synthesized Catechin, in Vitro. *Journal of Health Science* 51(4) 492-496

78. Hurst WJ. (2002). *Analysis for Functional foods and Nutraceuticals*. Edited by W. Jeffrey Hurst. CRC Press LLC, USA Capitulo 3

79. Rayman MP. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356:233-241.

80. Lockitch G. (1989). Selenium: clinical significance and analytical concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci.*27:483-541.

81. Dugo G, La Pera, L, Pollicino D y Saitta M. (2003). Determination of Selenium Content in Different Types of Seed oils by cathodic stripping potentiometry (CSP). *J. Agric. Food Chem.* 51: 5598-5601.

82. Rice-Evans, Miller N, Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med.* 21(3) 417

83. Arts, M.J.T.J., Dalinga J, Voss HP, Haenen G, Bast A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry* 88: 567-570.

84. Sánchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F. (1998). A Procedure to Measure la Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci Food Agric.*76: 270-276

85. Blois M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199- 1200
86. Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *J. Sci. Technol* 26(2): 211-219
87. Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239 (1): 70-6
88. Bonoli M, Verardo V, Marconi E Caboni M. (2004). Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5195-5200.
89. Thaipong K, Boonpraob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawking D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and analysis* 19: 669-675
90. Halvorsen B, Carlsen M, Phillips K, Bohn S, Holte, K, Jacobs D, Blomhoff R. (2006). Content of redox-active compounds (i.e., antioxidants) in food consumed in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* (84) 95-135
91. Singleton V L, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16: 44-58

92. Prior R L and Cao, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 83, 950-956.
93. Spanos G, Wrolstad R. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 1565-1571
94. Kahkonen MP, Al Hopia, Heikki J, Jussi-Pekka R, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962
95. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559
96. I. Aguilar, Ana María. II. Calzadilla, Alvaro. III. (sin año). Malnutrition in children—Bolivia. 2. Malnutrition in children—Bolivia—Social aspects.. Inter-American Development Bank. Research Dept. IV. Latin American Research Network. V. Title. VI. Series.
97. Temas globales y regionales de emergencia: “Iniciativa para América Latina y el Caribe sin Hambre”.30ª conferencia Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Brasil, 2008, Octubre 14-18.
98. [http://www.portalplanetasedna.com.ar/hambre\\_mundial.htm](http://www.portalplanetasedna.com.ar/hambre_mundial.htm) (extraído el 25 de mayo de 2009)
99. <http://www.bolivia.com/noticias/autonoticias/DetalleNoticia23137.asp> (extraído el 25 de mayo de 2009)

100. <http://www.consumer.es/web/es/solidaridad/2004/11/24/112363.php>  
extraído el 25 de mayo de 2009)
101. <http://www.consumer.es/web/es/solidaridad/2007/05/24/163049.php>  
extraído el 25 de mayo de 2009)
102. Maldonado O, Jiménez E, Guapillo M, Ceballos G y Méndez E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev. Med. UV, Julio-Diciembre. Pag 1-8.
103. Benbrook CM. (2005). Elevating Antioxidan Levels in Food through Organic Farming and Food ProcessingThe Organic Center for Education E Promotion. Science Review.
104. Self, R. (2005). Extraction of Organic Analytes from Foods. A Manual of Methods. Peter S. Belton
105. Alvarado, JA. (2012). Protocolos de CEIQA. Ciencias Puras, Carrera Química, UMSA (2da versión)
106. Saura-Calixto F, Goñi I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. Food Chemistry 94: 442-447.
107. Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J and Melby C. (2002). Antioxidant properties of Cereal Products. Food –Chemistry and Toxicology.Pag. 1-4.
108. Ragae, S., Abdel-Aal, E. M., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. Food Chemistry, 98, 32-38

109. Gallardo C, Jimenez L & García-Conesa, M.T. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*, 99, 455-463.
110. Zielinski H, &Kozłowska H, (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2008-2016.
111. Awika J, Rooney, L, Waniska R. (2004). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 90: 293-301.
112. Saura Calixto F.D. (2007). *Ingredientes Funcionales en Europa e Ibero America: Obtención, Evaluación y Aplicaciones*. Depto. Metabolismo y Nutrición (IF-CSIC), Madrid, España. Presentación ppt.
113. Lingnert H, Eriksson C.E. and Waller G.R. (1983). Characterization of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose in the Maillard Reaction in Foods and Nutrition. Ed. G.R. Waller y M.S. Feather, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser, 215-335. En: Badui S. *Química de los alimentos* (1993). *Química De los Alimentos*. Longman de México Editores, S.A. de C.V. Pag: 71-84
114. Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt E.K and Gallagher E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry* 119: 770-778
115. Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. (2007) *Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas*. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y agroexportaciones.

116. Araya H, Clavijo C, Herrera C. (2006). Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Volumen 56(4)
117. Yongyan H, Baili F, Tao D, Pengtao L, Jinfeng G and Yan C.(2006). Antioxidant Activity of Ethanol Extracts of Different Buckwheat. Section F Nutrition and pharmacy. Proceedings of the 10<sup>th</sup> international symposium on buckwheat
118. Danihelová, M, Jantová S and Sturdík E. (2013). Cytotoxic and Antioxidant activity of buckwheat hull extracts. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. Special issue on BQRMF 2: 1314-1323
119. González-Sanjosé M.L. (sin año). Substancias con actividad antioxidante de la cerveza: contribución de la fracción fenólica. En: V Congreso Internacional: Alimentación, nutrición y dietética. Madrid, España.
120. Garzón GA. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. Acta biol. Colomb. Vol. 13 (3): sep-dic.
121. Karadeniz F, Burdurlu H, Koca N, Soyer Y. (2004). Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. Turk J. Agric for. 29 (297-303)
122. Palomo I, Yuri J, Moore-Carrasco R, Quilodrán A, Neira A. (2010). El consumo de manzanas contribuye a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: Antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. Rev. Chil Nutr Vol.37, N°3, 377-385.

123. Muñoz A, Ramos F, Alvarado C, Castañeda B. (2007). Evaluación de la Capacidad Antioxidante y Contenido de Compuestos Fenólicos en Recursos Vegetales Promisorios. Rev. Soc. Quím Perú. 73 (3) 142-149

124. Zavala-Nigoa J, Loarca-Piña G y Garcia-Gasca T. (sin año, mayor a 2005). Evaluación del Contenido Fenólico, Capacidad Antioxidante y Actividad Citotóxica sobre Células Caco-2 del extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro, México. Presentado en: 2° Congreso Nacional de Química Médica.

125. Peng S, Peng L, William J.(2005). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Science and Technology Programme, Department of Chemistry, National University of Singapore.

126. Garcia J, De la Rosa, L, Herrera B, Gonzalez A, López J, González G, Ruiz S y Alvarez E. (2011). Polyphenol and antioxidant capacity quantification in peaches commercialized in Ciudad Juarez, Mexico. *Tecnociencia Chihuahua*. Vol V (2) Mayo-Agosto

## ANEXOS

**Anexo 1.** Contenido de Lisina, Metionina, Treonina y Triptófano en granos andinos y en trigo (mg de aminoácidos/g de proteína).

<b>Aminoácidos</b>	<b>Quinoa</b>	<b>Cañihua</b>	<b>Amaranto</b>	<b>Trigo</b>
Lisina	68	59	67	29
Metionina	21	16	23	15
Treonina	45	47	51	29
Triptófano	13	8	11	11

**Anexo 2.** Cañihua: Contenido de los cuatro aminoácidos esenciales en comparación a los del arroz y del trigo (mg de aminoácido/g de proteínas)

<b>Aminoácidos</b>	<b>Kañihua (a)</b>	<b>Arroz (b)</b>	<b>Trigo (b)</b>
Lisina	59.0	26.0	29.0
Metionina	16.0	15.0	15.0
Treonina	47.0	24.0	29.0
Triptófano	9.0	10.0	11.0

**Anexo 3.** Análisis proximal de la cañihua en comparación al arroz y trigo.

<b>COMPONENTE</b>	<b>CAÑIHUA</b>	<b>ARROZ</b>	<b>TRIGO</b>
Proteínas	14.0	6.2	8.6
Grasas	4.3	0.8	1.5
Carbohidratos	64.0	76.9	73.7
Fibra	9.8	0.3	3.0
Ceniza	5.4	0.6	1.7
Humedad	12.2	15.5	14.5

**Anexo 4.** Cañihua: contenido de ácidos grasos insaturados (% del total).

<b>GRASA</b>	<b>KAÑIHUA</b>
Acido linoleico (Omega 6)	42.59
Acido oleico (Omega 9)	24.25
Acido linoleico (Omega 3)	6.01
Total	72.85

**Anexo 5.** Análisis de Macrominerales y Microminerales de Variedades Peruanas.

<b>MUESTRA</b>	<b>CALCIO mg/100 g</b>	<b>FOSFORO mg/100 g</b>	<b>POTASIO mg/100 g</b>	<b>MAGNESIO</b>	<b>HIERRO mg/100 g</b>	<b>MANGANESO mg/100 g</b>	<b>CINC mg/100 g</b>
Maca V1	499	220	232	68	12,5	19	37
Mashua V1	608	146	272	21	1,4	150	412
Kiwicha V1	171	190	20	70	3,2	22	32
Cañihua V1	161	104	45	1,42	15,2	16	28

**Anexo 6.** Análisis proximal de granos: Maca, Mashua, Kiwicha, Cañihua.

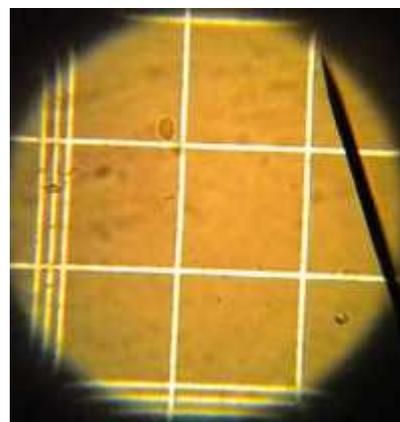
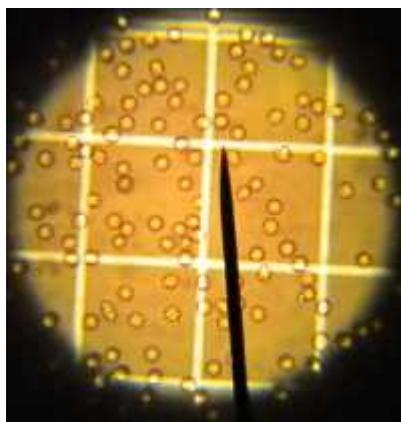
<b>MUESTRA</b>	<b>Humedad</b>	<b>Sólidos totales</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Fibra</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Grasa</b>	<b>Glúcidos (Carbohidratos)</b>
Expresado en g/100 g de alimento							
Maca V1	78,3	21,7	2,50	5,14	1,83	0,82	11,4
Mashua V1	89,9	10,1	0,55	0,80	1,72	0,41	6,61
Kiwicha V1	12,1	87,9	2,20	0,28	10,81	0,41	74,2
Cañihua V1	12,2	87,8	5,50	6,28	13,46	0,24	62,32

## Anexo 7. Contenido de Saponina en muestras de cañihua

<u>MUESTRAS</u>	<u>[SAPONINA] (Método 1)</u> g sap/100 g g cañihua	<u>[SAPONINA] (Método 2)</u> g sap/100 g cañihua
Kullaca	0.0006	0.0330
A-88	0.0019	0.0785
A-155	0.0002	0.0301
A-173	0.0007	0.0541
A-187	0.0007	0.0670
A-300	0.0005	0.0639

Fuente: Obtenidos por determinación propia

**Anexo 8.** Hemólisis de glóbulos rojos O Rh (+) en presencia de Saponina vista a microscopio.



**Anexo 9.** Transformación de unidades de  $\mu\text{g}$  trolox eq/g.d.b a  $\mu\text{mol}$  ET/g muestra seca.

$$4200 \times 10^{-6} \text{g trolox /g} * 1 \text{ mol trolox/}250.29 \text{ g} = 16.78 \times 10^{-6} \text{ mol/g} = \mathbf{16.78 \text{ a } \mu\text{mol ET/g}}$$

$$4050 \times 10^{-6} \text{g trolox /g} * 1 \text{ mol trolox/}250.29 \text{ g} = 16.18 \times 10^{-6} \text{ mol/g} = \mathbf{16.18 \text{ a } \mu\text{mol ET/g}}$$

### Anexo 10. Curva Estándar de Trolox para ABTS

[trolox], $\mu\text{M}$	Abs	%Inhibición
0	0,6374	0
20	0,5923	7,08
50	0,5247	17,68
100	0,4156	34,80
150	0,2926	54,09
200	0,1869	70,68

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos anteriores:  $y = 0.354x$

(1)  $\%Inh = (0.6374 - 0.1874) / 0.6374 * 100 = 70.599\%$

(2)  $C = 70.599 / 0.354 = 199.43$

(3)  $TAC = 199.43 * ((2.5149 + 17.775) / 16.7581) * ((16.7581 - 4.0564) / 2.5149) * 0.001 =$   
 $TAC = 1.22 \mu\text{molTrolox/g}$

N°	Código	s	S	E	R	Abs	%Inhib	Slope	TAC
		(g)	(g)	(g)	(g)				( $\mu\text{molTrolox/g}$ muestra seca)
1	V-1	2,5149	17,775	16,7581	4,0564	0,1874	70,6	0,3540	1,22