

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ACTIVIDAD NEUROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO FOLIAR
METANÓLICO DE *Lepidium meyenii* (MACA) SOBRE CÉLULAS
PC12”**

Presentada por:

Angel Alfredo Rodríguez Huamán

Tesis para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima-Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ACTIVIDAD NEUROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO FOLIAR
METANÓLICO DE *Lepidium meyenii* (MACA) SOBRE CÉLULAS
PC12”**

Presentada por:

Angel Alfredo Rodríguez Huamán

Tesis para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

M. Sc. Elva Ríos Ríos

PRESIDENTE

Biol. Milagros Chang La Rosa

MIEMBRO

Mg. Teófilo Chire Murillo

MIEMBRO

Mg. Jorge Antonio Chávez Pérez

ASESOR

Este logro va dedicado

A mis padres Angel y Dora, mis hermanos Sebastián y Angie, mis abuelos, mis tíos, y primos. A mis maestros, Ariela, Marisol, Ana, Elena, Yolanda, Félix y Chávez.. Y principalmente a mi abuela Yolanda Mayo Ramos, quién cada mañana de mi vida me apoyó, con una palabra de aliento, con un plato de comida, con tan solo un “chau hijito” que recordaré toda mi vida.

“Ha pasado mucho tiempo desde aquel chiquito que llegó llorando a mi casa... Has logrado mucho hijo...”

Agradecimientos

A quienes hicieron posible este proyecto, principalmente, al profesor Jorge Chávez, quien me apoyó y guio a lo largo del desarrollo de este trabajo en el Laboratorio de Neurotoxicología Conductual del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (IIBBM). También debo agradecer al Lic. Roy Andrade y al Dr. Luis Angel Aguilar, quienes me capacitaron en las metodologías para cultivos celulares y me brindaron todas las facilidades para el uso de las instalaciones del Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Un agradecimiento especial a INNOVATE y al proyecto 184-FINCYT-IB-2013 “Búsqueda y Selección de Compuestos Neuroactivos con Potencial Neuroprotector: Caracterización Celular/Molecular de compuestos biológicamente activos de 3 plantas andinas nativas del Perú”.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | i |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. REVISION DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. MACA “Lepidium meyenii Walp.”..... | 4 |
| 2.1.1. TAXONOMIA Y ORIGEN..... | 4 |
| 2.1.2. PROPIEDADES Y USO TRADICIONAL..... | 5 |
| 2.1.3. TOXICIDAD..... | 8 |
| 2.2. PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS..... | 9 |
| 2.2.1. COMPUESTOS FENOLICOS..... | 9 |
| 2.2.2. MACAENOS Y MACAMIDAS..... | 10 |
| 2.2.3. GLUCOSINOLATOS..... | 12 |
| 2.2.4. ALCALOIDES..... | 12 |
| 2.3. FISIOLÓGÍA DE PLANTAS ALTOANDINAS..... | 13 |
| 2.4. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO..... | 14 |
| 2.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA NERVIOSO..... | 16 |
| 2.6. PATOLOGÍAS NEURODEGENERATIVAS..... | 18 |
| 2.7. ESTRÉS OXIDATIVO Y NEURODEGENERACIÓN..... | 19 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO..... | 21 |
| 3.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO..... | 21 |
| 3.2.1. Estabilización de la muestra..... | 21 |
| 3.2.2. Obtención de los extractos..... | 21 |
| 3.2.3. Tamizaje fitoquímico..... | 21 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.3. | ANÁLISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE..... | 23 |
| 3.4. | COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES..... | 24 |
| 3.5. | ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR GC-MS..... | 24 |
| 3.6. | EFFECTO NEUROBIOLÓGICO SOBRE CELULAS PC12..... | 25 |
| 3.6.1. | DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR..... | 25 |
| 3.6.2. | DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR..... | 26 |
| 3.6.3. | DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA..... | 26 |
| 3.6.4. | DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE OXIDO NITRICO..... | 26 |
| 3.7. | ÁNÁLISIS ESTADISTICO..... | 26 |
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 27 |
| 4.1. | ANÁLISIS FITOQUÍMICO..... | 27 |
| 4.2. | ANÁLISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE..... | 28 |
| 4.3. | CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES..... | 29 |
| 4.4. | DETERMINACION DE COMPUESTOS POR GC-MS..... | 29 |
| 4.5. | EFFECTO NEUROPROTECTOR SOBRE CÉLULAS PC12..... | 30 |
| 4.5.1. | DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR..... | 30 |
| 4.5.2. | DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR..... | 31 |
| 4.5.3. | DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA..... | 32 |
| 4.5.4. | DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO..... | 33 |
| V. | CONCLUSIONES..... | 35 |
| VI. | RECOMENDACIONES..... | 37 |
| VII. | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 38 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: Estructura química del Macaeno y Macamida..... | 10 |
| FIGURA 2: Proceso de formación de Macamidas..... | 11 |
| FIGURA 3: Estructura química base de los glucosinolatos y lista de los principales encontrados en Maca..... | 12 |
| FIGURA 4: Alcaloides descritos en la raíz de maca..... | 13 |
| FIGURA 5: Capacidad antioxidante de las fracciones del extracto foliar metanólico de <i>Lepidium meyenii</i> por el método ABTS..... | 28 |
| FIGURA 6: Cromatograma del extracto metanólico de hojas de <i>Lepidium meyenii</i> | 29 |
| FIGURA 7: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la Viabilidad Celular..... | 31 |
| FIGURA 8: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la Citotoxicidad..... | 32 |
| FIGURA 9: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la Actividad de la Superóxido Dismutasa..... | 33 |
| FIGURA 10: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la liberación de Óxido Nítrico..... | 34 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1: Clasificación botánica..... | 4 |
| TABLA 2: Macamidas presentes en Maca..... | 11 |
| TABLA 3: Análisis fitoquímico del extracto foliar de <i>Lepidium meyenii</i> | 27 |
| TABLA 4: Compuestos mayoritarios en el extracto metanólico de hojas de <i>Lepidium meyenii</i> detectados por GC-MS | 30 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|------|--|----|
| 8.1. | ESQUEMA DE MARCHA FITOQUIMICA..... | 51 |
| 8.2. | REGISTRO FOTOGRÁFICO..... | 52 |
| 8.3. | METDOLOGÍA ANÁLISIS FITOQUÍMICO..... | 54 |
| 8.4. | METODOLOGÍA PARA EL ANALISIS DE CAPACIDAD ANTIXODIANTE (METODO ABTS)..... | 57 |
| 8.5. | CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES..... | 61 |
| 8.6. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 64 |

RESUMEN

Muestras frescas de hojas de *Lepidium meyenii* colectadas a 4106 m.s.n.m. en el distrito de Ramacancha (Latitud Sur 11° 9' 2.3" S y Longitud Oeste : 76° 3' 44.6" W), Junín - Perú, fueron procesadas en el Laboratorio de Neurotoxicología Conductual del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina y en el Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con el fin de obtener extractos foliares y evaluar la actividad neurobiológica en células PC12 sometidas al efecto citotóxico de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a través de la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS, la viabilidad celular y ensayos de citotoxicidad. Los resultados de los ensayos de actividad antioxidante, mostraron valores máximos de 2262.37 y 1305.36 TEAC, para las fracciones metanólica y acuosa respectivamente. Estos valores concuerdan con lo revelado por el estudio fitoquímico, el cual evidencia la presencia de principales grupos de fenoles, flavonoides y terpenos, en las diferentes fracciones. Así mismo, se reportó un contenido de fenoles totales de 738 mg AG/100g los cual se encuentra también relacionado con la actividad antioxidante. Los ensayos de viabilidad celular a dosis de 10 ug de extracto, mostraron un incremento del 31% y 60% a las 6 y 12 horas de pretratamiento, respectivamente. Los ensayos de citotoxicidad a la misma dosis y tiempo de exposición mostraron una reducción en 31.4% y 47.8% en la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) y un incremento de más de 400% en la actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD). Esto nos permite afirmar que el extracto foliar metanólico de *Lepidium meyenii* “maca” presenta actividad neurobiológica de protección antioxidante *in vitro*, incremento de la viabilidad celular y reducción de la citotoxicidad frente al estrés oxidativo generado por la 6-OHDA.

I. INTRODUCCIÓN

Reportes del 2015 revelan que más de 46 millones de personas sufren demencia en todo el mundo; esta cifra es superior a la de la población española. Se estima que para el 2050 esta cifra aumentará hasta los 131,5 millones. Por otra parte, desde un enfoque económico, el coste total de la demencia en todo el mundo asciende 818 000 millones de USD y en 2018 alcanzará el billón de dólares. Esto significa que si el cuidado de la demencia fuera un país, sería la décimo octava economía más grande del mundo, con un valor de mercado superior al de Apple (742 000 millones USD), Google (368 000 millones USD) y Exxon (357 000 millones USD) (ADI, 2015).

En la actualidad, se calcula que el 94% de las personas que sufren demencia en países con ingresos bajos y medios reciben cuidados domiciliarios. Existen regiones con sistemas sanitarios y de asistencia que no proporcionan ninguna ayuda a personas que sufren demencia o sus familias, o cuya ayuda es muy limitada (ADI, 2015).

La prevalencia de la demencia en personas de más de 60 años oscila entre el 4,7% en Centroeuropa y el 8,7% en el Norte de África/Oriente Medio, aunque todas las estimaciones regionales restantes se sitúan en una banda relativamente más estrecha de entre el 5,6 y el 7,6%. La prevalencia se duplica cada 5,5 años de edad en Norteamérica; 5,7 años en Asia-Pacífico; 5,9 años en América Latina; 6,3 años en Asia Oriental; 6,5 años en el Centroeuropa y Europa Occidental; 6,6 años en el Sur de Asia; 6,9 años en Australia; 7,2 años en el Caribe y África Subsahariana, y 10,6 años en el Sureste asiático. Las estimaciones analizadas revelan que el aumento del número de personas que sufren demencia será mucho más pronunciado en países con rentas bajas y medias que en países con rentas altas. Entre 2015 y 2050, el número de personas con demencia en lo que son ahora países con rentas altas aumentará un 116%. En países con rentas medio-altas se producirá un aumento del 227%, en países con rentas medio-bajas se producirá un aumento del 223% y en países con rentas bajas el aumento será del 264% (ADI, 2015).

En el contexto nacional, estudios del 2008 revelan que la prevalencia de demencia en una comunidad urbana de Lima, es de 6,85%, siendo la enfermedad de Alzheimer el diagnóstico más frecuente (56,2%). Dicha prevalencia se ve incrementada con el aumento de la edad, en el género femenino y a un nivel educativo bajo. Esta prevalencia se ve incrementa con la edad, de 1,1% en el grupo etario de 65 a 69 años de edad hasta 45,1% en aquellos de más de 85 años de edad (Custodio *et al.*, 2008).

La demencia se presenta como un síndrome caracterizado por una degeneración progresiva de la memoria, de las funciones ejecutivas, lenguaje y de otras áreas de la cognición, asociada a síntomas conductuales, que repercuten en el normal desenvolvimiento del individuo en su entorno social. Este proceso es progresivo e irreversible. Dentro del espectro de demencias, la más representativa es la asociada a la enfermedad de Alzheimer (EA), responsable del 50 al 60 % del total de casos. La demencia y la enfermedad de Alzheimer se asocian con factores genéticos y ambientales; debido a ello, existe un interés creciente en la investigación científica en profundizar en aquellos factores que son modificables y que permitirían prevenir la expresión clínica o comienzo más temprano de esta enfermedad. Si bien, el envejecimiento es el factor de riesgo más aceptado, existen evidencias epidemiológicas, biológicas y sociales que apoyan la hipótesis de que los factores de riesgo actúan durante toda la vida y actúan de forma independiente, acumulativa e interactiva para causar la enfermedad (Llibre, 2014).

Por otra parte, otra de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas a la demencia es la enfermedad de Parkinson (EP), la cual se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y la concomitante pérdida de terminales nerviosas dopaminérgicas en el caudo-putamen, que es la principal área de proyección de las neuronas de la sustancia negra. Así mismo, en el desarrollo de esta enfermedad se evidencia la acumulación de cuerpos de Lewy, inclusiones proteínicas intracitoplasmáticas que contienen α -sinucleína, sinfilina-1, componentes de la vía proteosómica de ubiquitina y parkina. Existen anomalías bioquímicas en el cerebro con EP, tales como deficiencias en el complejo I mitocondrial, disminución extracelular de tiores, incremento del hierro oxidante (FeII) en la sustancia negra, así como daño oxidativo, que incluye oxidación de DNA, nitración e incremento en grupos carbonilos de proteínas, en especial en la sustancia negra. Estas inclusiones contienen neurofilamentos fosforilados (Angoa y Rivas, 2007).

El estrés oxidativo toma un papel fundamental en la fisiopatología de estas enfermedades neurodegenerativas; las cuales se caracterizan por la presencia de inflamación, mutaciones genéticas, agregados inapropiados de proteínas (cuerpos de Lewy, placas amiloideas), activación glial y disfunción mitocondrial que finalmente conducen a un deterioro progresivo neuronal (Angoa y Rivas, 2007).

En este sentido, se ha observado que las plantas emplean mecanismos que les permiten mermar los daños ocasionados por el estrés oxidativo. Uno de estos mecanismos es la síntesis de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides, los que se acumulan en las células de la epidermis, reduciendo el daño ocasionado en diferentes componentes celulares (Carrasco 2009; Hollosy 2011).

El propósito de este trabajo es evaluar los efectos neurobiológicos del extracto foliar metanólico de maca sobre un cultivo de células PC12 y relacionar estos efectos con la presencia de compuestos antioxidantes.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. MACA “*Lepidium meyenii* Walp.”

2.1.1. TAXONOMIA Y ORIGEN

TABLA 1: Clasificación botánica

| | |
|--------------------|--|
| División: | Fanerógama |
| Subdivisión: | Angiospermae |
| Clase: | Dicotyledoneae |
| Sub clase: | Archyclamidaeae |
| Orden: | Rhoedales o Papaverales |
| Familia: | Brassicaceae o Cruciferae |
| Género: | <i>Lepidium</i> |
| Nombre científico: | <i>Lepidium meyenii</i> Walpers |
| Nombre común: | Maca, maca-maca, maino, ayak chichira, ayak willku |

Del origen de la maca se conoce muy poco y aún no se ha identificado una especie silvestre que se considere como su ancestro y a partir del cual se le domesticó 1,200 años antes de Cristo. Se presume que esta provendría de la sierra central de los Andes del Perú, donde se cultiva en regiones con altitudes excepcionales que comprenden desde los 3,800 a los 4,800 msnm, en condiciones ambientales extremas debido a las bajas temperaturas, heladas, granizadas, sequias y fuertes vientos. Se cree que habría sido domesticada por grupos humanos provenientes de la selva peruana denominados “Pumpush”, que poblaron zonas como Cuncush Runa en la meseta de Bumbush o Bombón, en la que se ubica la laguna Chinchaycocha o laguna de Junín. Según Javier Pulgar Vidal (1978), la palabra maca provendría de las palabras Ma que significa “de altura” (que ha sido cultivada o cultivada en la altura) y Ca “comida que fortalece.” En Quechua, significaría “comida con fuerte sabor”.

Pertenece a la familia de las Brasicáceas (Cruciferas) y es considerada como la única especie del genero *Lepidium* domesticada en los andes. Originalmente el cultivo estuvo restringido

a los departamentos de Junín y Pasco, en las localidades de Huayre, Carhuamayo, Uco, Ondores y Junín y en Ninacaca, Vico y Cerro de Pasco. Actualmente se encuentran cultivos en: San Pedro de Cajas, Vico, Huayre, Junín, Carhuamayo, Óndores del departamento de Junín; y en Ninacaca, Huallay, Tingiahuarco, Simón Bolívar y otros caseríos del departamento de Pasco, a una altitud que corresponden al piso ecológico de la puna (Quirós & Aliaga, 1997).

El nombre científico *Lepidium meyenii* Walp se ha venido usando para referirse a la maca, sin embargo en 1989 la doctora Gloria Chacón encontró que no había correspondencia entre los caracteres botánicos de la especie cultivada tradicionalmente en los andes centrales peruanos y las características de *Lepidium meyenii* Walp, razón por la cual fundamentó la necesidad del cambio del nombre científico de *Lepidium meyenii* Walp al de *Lepidium peruvianum* Chacón (Chacón, 1961).

2.1.2. PROPIEDADES Y USO TRADICIONAL

La propiedad más importante de la maca conocida en la tradición Andina es su efecto en la fertilidad; ésta es la cualidad principal atribuida a la maca desde el Siglo XVI, y considerada como uno de los factores para el aumento de la población en las zonas más altas del Perú. También se le usa para tratar la frigidez, impotencia sexual y la debilidad mental (Obregón, 1998; Johns, 1980). Los efectos de la maca sobre la fertilidad han sido comprobados en ratas, en las que ocurre un aumento de la espermatogénesis, maduración de folículos y aumento de la progenie al suministrarles un extracto alcaloide de maca (Chacón, 1961); en cuyes, que al ser alimentados con maca seca y en polvo aumentan su fertilidad (100%) y su progenie (Álvarez, 1993; Jeri, 1999); en ovejas, que al ser alimentadas con 80 g de maca por 15 días aumentaron el volumen del semen, la concentración espermática y la motilidad de los espermatozoides; en vacas infértiles, que recuperan la fertilidad después de alimentarse con maca (Pulgar, 1978). Las propiedades de la maca de mejorar la fertilidad podrían deberse a la presencia de isotiocianatos biológicamente activos derivados de la hidrólisis de glucosinolatos, específicamente debido al benzil-isotiocianato y el p-metoxibenzil isotiocianato (Li, et al., 2001).

La maca también se conoce como un afrodisíaco, que cura la frigidez en mujeres y es un remedio para la impotencia en hombres (Pulgar, 1978; Obregón, 1998). Esta propiedad de

la maca podría deberse a la presencia de prostaglandinas y esteroides en el hipocótilo-raíz, y de amidas de ácidos grasos poli-insaturados (Li, et al., 2001).

Otra propiedad medicinal atribuida a la maca es su efecto anti-cancerígeno (Quiroz y Aliaga, 1997). Sin embargo, existe una larga lista de artículos científicos que se refieren al efecto anticancerígeno del glucosinolato y del benzil isotiocianato de varias especies de la familia Brassicaceae a la cual también pertenece la maca (Wattenberg, 1987, 1981). Según Johns (1980), los isotiocianatos de extractos de maca tendrían también efecto anticancerígeno.

La maca es también tradicionalmente usada como un regulador de alteraciones de la menstruación y la menopausia, y alivia el insomnio y la disminución de la audición y la visión (Pulgar, 1978; Obregón, 1998). Además, esta planta se ha usado desde tiempos inmemoriales por sus propiedades para revitalizar (Obregón, 1998), para tratar la malnutrición, ayudar a la convalecencia y restaurar la habilidad física y mental (Quiroz y Aliaga, 1997).

En los estudios realizados por Samame y colaboradores (2002), se observó un aumento notable en los niveles de hemoglobina y hematocrito en los animales tratados con maca por vía oral por espacio de 60 días. López Fando et al. (2004) investigaron la actividad anti estrés del *Lepidium peruvianum* Ch., y Alzamora G y col (2005) demostraron el efecto inmunomodulador y la estimulación en la producción de interferón- γ (IFN- γ) en cultivos de linfocitos de pacientes infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Haito Ch.K et al. observaron el efecto anti estrés de *Lepidium meyenii* al prevenir la producción de úlceras gástricas en ratas sometidas a estrés por inmovilización. Fernández S. y Osorio J (2005), evaluaron en 60 pacientes menopáusicas que la maca permitía un tratamiento eficaz en el manejo del cuadro clínico de las pacientes con climaterio con una dosis de 1.5 a 3 gramos por día.

Varios fitoesteroides han sido aislados de la maca atribuyéndoles también actividad anti cancerígena y sobre la fertilidad. Además de estos grupos de compuestos se han descrito otras moléculas que actúan inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa. También se ha sugerido que los compuestos existentes en los extractos hidroalcohólicos de la maca negra actuarían sobre el aprendizaje y la memoria. Este efecto se debería a la presencia de los compuestos polifenólicos como la quercetina y antocianinas (Rubio, et al., 2011).

Estudios realizados en pacientes con Alzheimer tratados con rivastigmina hallaron disminución de la actividad de la butirilcolinesterasa; esto indicaría una mejoría cognitiva, pues según la literatura, la actividad aumentada se relaciona con la pérdida de memoria y el aprendizaje. Esto mismo fue observado en animales que recibieron maca frente al grupo control, registrándose una menor actividad de la enzima butirilcolinesterasa. Lo que indicaría que el extracto de maca estaría actuando como un neuroprotector sobre los mecanismos de defensa antioxidantes y de pérdida de la memoria y aprendizaje (Ore, et al., 2011a).

Estos mismos autores administraron harina de maca (4 a 6 gramos por día) en la dieta de animales diabéticos observándose una reducción en un 50% en los niveles de glicemia, aumento en los niveles de insulina 22% y aumento en los niveles de vitamina C respecto al grupo control. La administración de maca en una dosis de 4 gramos por día disminuyó el daño oxidativo, pues redujo la formación del complejo MDA-TBARS en 54% con respecto al grupo control, por lo que concluyeron que la administración de harina de maca amarilla a animales diabéticos mejora el metabolismo de la glucosa, regulando la glicemia y elevando los niveles de insulina. También, incrementa las defensas antioxidantes y por ende protege del daño oxidativo que se presenta en la diabetes (Ore, et al., 2011b).

Se han realizado estudios de la acción fisiológica que ejercen los alcaloides de maca generando una estimulación marcada en el desarrollo de los folículos de Graaf, y un aumento en los niveles de estrógenos de ratas suministradas con maca por vía oral. Así mismo, Chacón (1961), en un estudio sobre la composición fitoquímica y efectos de la maca sobre el aparato reproductor en ratas, encontró un incremento significativo en la procreación de las ratas, así como cambios histológicos en los órganos internos, tanto masculinos como femeninos. Otros estudios realizados en ratas, ratones y cobayos, han demostrado las propiedades de la maca sobre el comportamiento sexual y sus efectos positivos sobre la fertilidad: incremento en el número de espermatozoides en tubos seminíferos y aumento en el número de folículos de Graaf, como evidencia de estimulación de la maduración folicular. (Zheng, 2000; Matos, 1995; Álvarez, 1993). Los estudios de embriones pre- y post-implantacionales han generado nuevas perspectivas en la acción de drogas y químicos naturales, con la finalidad de entender la toxicidad en la gestación temprana.

Según Suarez et al. (2009) el extracto de maca contiene metabolitos que participan favoreciendo una respuesta más eficiente al ejercicio extenuante, como el nado forzado; permitiendo la disipación de los radicales libres generados a nivel de cadena respiratoria por

el incremento del consumo de oxígeno, coadyuvando a la actividad de la SOD y catalasa lo que evitaría una mayor peroxidación lipídica. Por otro lado, también proponen una mayor eficiencia en el metabolismo aeróbico, un incremento del umbral anaeróbico, explicado por una menor actividad del lactato deshidrogenasa. Debido a ello, proponen a la maca como un adaptógeno, teniendo en cuenta que este concepto está referido a sustancias naturales que se encuentran solamente en algunas plantas y que ayudan al organismo a alcanzar un rendimiento óptimo mental, físico y de trabajo.

Wattenberg (1987) estudió los efectos inhibitorios del benzil isotiocianato sobre la carcinogénesis inducida por los químicos carcinógenos dimetil nitrosamina y benzopireno, en ratones. Los resultados mostraron que el compuesto benzil isotiocianato, un derivado natural en las plantas crucíferas, inhibe completamente la formación de tumores tanto en el estómago como en los pulmones.

Desde 1960 diferentes trabajos de investigación con la maca han reportado la presencia de macro y micronutrientes en concentraciones elevadas, reportándose que la maca contiene 16 - 18% de proteínas, que tiene 10 aminoácidos (aa) esenciales siendo rica en fenilalanina, valina y lisina además de aminoácidos no esenciales. Tiene un bajo nivel de grasa conteniendo una alta concentración de ácidos grasos esenciales, presenta Vit C, Vit B12, Vit B1, Vit B3, Vit B6 Vit B2 y Vit E; además potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, zinc, cobre, selenio (Quiroz y Aliaga, 1997; Gonzales, 2012).

2.1.3. TOXICIDAD

Desde que se describieron las propiedades de la maca surgió el interés por conocer los niveles o grados de toxicidad que pudiera presentar la maca. Así, Chacón (1961), luego de trabajar con ratas hembras albinas inoculada vía intraperitoneal con extracto alcaloidal de «maca», demostró un incremento en la maduración folicular, concluyendo que el extracto acuoso de *Lepidium meyenii* no afecta el desarrollo normal, ni la viabilidad de los embriones pre-implantacionales de ratón, sino que, por el contrario, puede favorecer el desarrollo de los mismos.

La administración de dosis 10 veces mayor que la dosis normal en humanos, en ratas, no registro diferencias en el peso corporal ni en los órganos del grupo control lo que da un indicio de la baja toxicidad de la maca. (Valerio & Gonzales, 2005)

D'Arrigo *et al.*, (2004), evaluaron el efecto del extracto acuoso liofilizado de *Lepidium meyenii* Walp sobre los embriones pre-implantacionales de ratón *Mus musculus*. Los resultados demostraron que el extracto acuoso liofilizado de maca (1g/Kg), no causaba ninguna alteración en el desarrollo normal de embriones, obteniéndose un porcentaje similar de embriones en Grado 1 entre el grupo control y el tratado (85,7% y 84,5%, respectivamente), mientras que el porcentaje más bajo de embriones degenerados (3,4%) lo tenía el grupo tratado. Lo mismo se observó al evaluar el porcentaje de los embriones normales: el grupo tratado con maca muestra un 87,9% de normalidad, y 12,1% de anormales. Finalmente, no se encontró ningún retraso en el desarrollo embrionario, observándose un 48,3% de embriones en estadio de blastocisto frente a un 48,2% del control.

Beltrán *et al.*, demostraron la ausencia de toxicidad de la maca al determinar la dosis letal media de este producto que superó los 15 g/Kg de peso del animal.

2.2. PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS

2.2.1. COMPUESTOS FENOLICOS

Los flavonoides son el grupo más común y ampliamente distribuido de los compuestos fenólicos de plantas. Estos compuestos presentan actividad antioxidante, actividad hepatoprotectora, antibacteriana, antiinflamatoria, anti cáncer y antiviral (Kumar y Pandey, 2013). Son sintetizados por la vía de fenilpropanoide.

Estos compuestos hidroxilados que se sintetizan en respuesta a infecciones microbianas en plantas y su función antioxidante se da por el grupo hidroxilo, el cual reacciona con los radicales libres y/o por la quelación de iones metálicos (Kumar y Pandey, 2013). El primer flavonoide identificado fue la rutina y en la actualidad hay más de 4000 identificados. Estos se pueden dividir en: flavonas (flavona, apigenina y luteolina), flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina y fisetin), flavanonas (flavanona, heperetina, y naringenina) y otros. La diferencia entre los grupos radica en el anillo C, mientras que la diferencia entre los

compuestos del mismo grupo radica en los anillos A y B. Además, estos compuestos se presentan como agliconas, glicosidos y derivados metilados. (Kumar y Pandey, 2013).

La actividad antioxidante presentada por diversas plantas está estrechamente relacionada con el contenido de polifenoles. Es debido a ello la importancia de la identificación de estos compuestos por métodos analíticos (Karamac et al. 2007; Berlowski et al, 2013). La mayoría de flavonas y flavonoles absorben en dos bandas: 320-385 y 250-285nm. Los grupos funcionales pueden dar algunos picos de absorción extra. Estos son de 367 para kaempferol, 371 para quercitina y 374 para mircetin. La mayoría de flavanonas presentan un máximo de absorción entre 270 y 295 nm. Por ejemplo, naringenina a 288, taxifolin a 285. Las antocianinas presentan un pico de absorción entre 450 y 560nm y entre 240 y 380nm (Kumar y Pandey, 2013). Un gran número de trabajos centrados en la extracción, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se han desarrollado en los últimos 25 años. El HPLC es la técnica de mayor aplicación en la separación y cuantificación de estos compuestos, aunque también se aplican técnicas de cromatografía de gases para su análisis (Khoddami et al, 2013).

2.2.2. MACAENOS Y MACAMIDAS

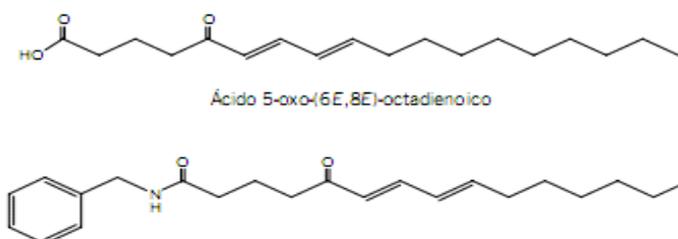


FIGURA 1: Estructura química del Macaeno y Macamida

Tomado de Optimización del contenido de compuestos bioactivos en maca durante su proceso productivo industrial. Esparza, 2012. Laboratorio de Bioanalítica, sección química. Pontificia Universidad Católica del Perú.

Se denominan así a ciertos ácidos grasos poli insaturados y sus correspondientes amidas presentes en la raíz de la maca a los que se les atribuye responsabilidad en la mejora de la actividad sexual. El contenido de estos compuestos varía considerablemente en diferentes muestras de maca, así en la maca seca el contenido de macaenos oscila entre el 0.09% y 0.45% y el de macainas entre el 0.06% y 0.52% (Cosio y Esparza, 2010).

TABLA 2: Macamidas presentes en Maca

| | |
|--|--|
| N-Bencil-pentadecanamida | N-(3-Metoxibencil)-9Z-octadecanamida |
| N-Bencil-hexadecanamida | N-Bencil-(15Z)-tetracosenamida |
| N(3-metoxibencil)-hexadecanamida | N-Bencil-9-oxo(12Z)-octadecenamida |
| N-Bencil-heptadecanamida | N-Bencil-9-oxo(12Z,15Z)-octadecadienamida |
| N-Bencil-octadecanamida | N-Bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida |
| N-Bencil-13-oxo-(9E,11E)-octadecadienamida | N-(3-Metoxibencil)-(9Z,12Z)-octadecadienamida |
| N-Bencil-5-oxo-(6E,8E)-octadecadienamida | N-3-Bencil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida |
| N-Bencil-(9Z)-octadecenamida | N-(3-Metoxibencil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida |

Tomado de Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón): composición química y propiedades farmacológicas.

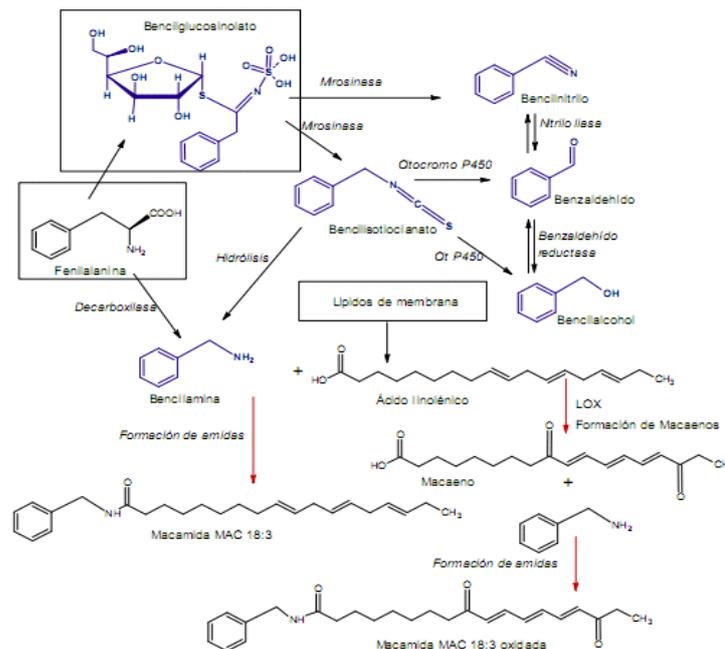


FIGURA 2: Proceso de formación de Macamidas

Tomado de Optimización del contenido de compuestos bioactivos en maca durante su proceso productivo industrial. Esparza, 2012. Laboratorio de Bioanalítica, sección química. Pontificia Universidad Católica del Perú.

Las macamidas se originan durante el proceso de secado por una serie de cambios bioquímicos complejos que incluyen reacciones hidrolíticas, oxidaciones y arreglos estructurales. Estos cambios ocurren secuencialmente en el tiempo y generan el perfil típico de la maca seca (Esparza, 2012).

2.2.3. GLUCOSINOLATOS

También conocidos como heterósidos sulfocianogénéticos, son compuestos azufrados que se sintetizan a partir de aminoácidos. Los glucosinolatos están dentro de vacuolas que al ser liberadas son inmediatamente hidrolizadas por un grupo de enzimas denominadas mirocinasas, esta es la razón del porque en las muestras frescas el contenido de glucosinolatos es mucho mayor en comparación con la maca seca. En comparación con otros miembros de la familia Brassicacea (brócoli, coliflor, repollo, etc.) el contenido de glucosinolatos de la maca es mayor en 100 veces. Se han reportado trabajos que indican actividad anticancerígena y antimicrobiana para estos compuestos (Arias, 2002).

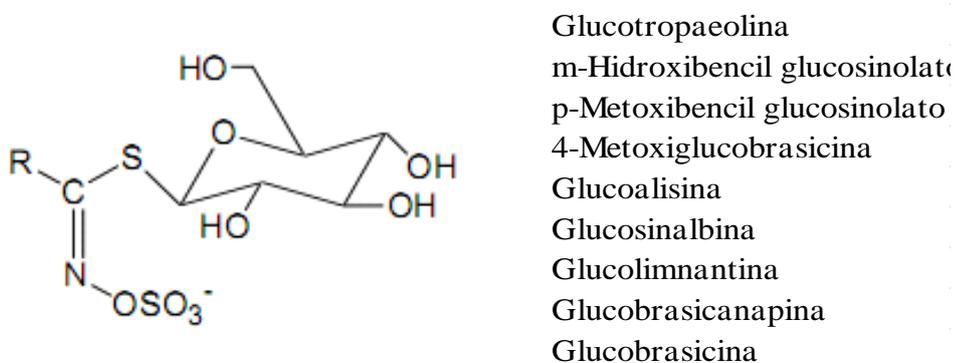


FIGURA 3: Estructura química base de los glucosinolatos y lista de los principales encontrados en Maca

Glucosinolatos descritos para la Maca donde varía en radical *

2.2.4. ALCALOIDES

Los alcaloides forman una cuantiosa y diversa familia de metabolitos secundarios de moléculas no relacionadas entre ellas mismas, siendo de gran importancia económica debido a sus propiedades farmacológicas. Son estos metabolitos los más frecuentes en el reino vegetal. Se calcula que se han encontrado unos 10 000 alcaloides en aproximadamente el 20 por ciento de plantas con flores, en su mayoría dicotiledóneas herbáceas (Hopkins, 1999).

Chacón (1961), encontró la presencia de alcaloides en *Lepidium peruvianum* Chacón, demostrando la acción fecundadora del extracto alcaloideo de maca. Para ello, lo inoculó en ratas obteniendo una notable estimulación de la maduración de los folículos de Graaf y engrosamiento del endometrio. Otros autores han sugerido actividad anticancerígena, sin

embargo la presencia de alcaloides en maca aún es discutida y no se ha determinado su estructura (Arias, 2002).

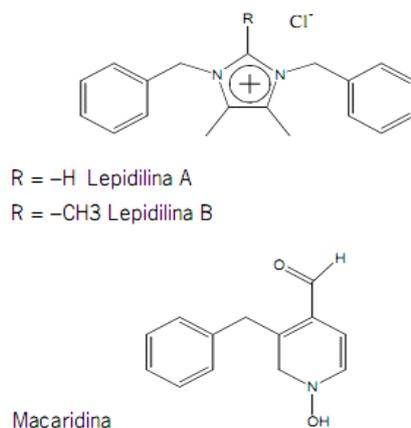


FIGURA 4: Alcaloides descritos en la raíz de maca

Tomado de Rocabado, *et al.* 2011

2.3. FISIOLÓGÍA DE PLANTAS ALTOANDINAS

La radiación UV se ve influenciada por la ubicación geográfica, siendo más intensa en latitudes próximas a la línea ecuatorial que en latitudes medias. Además, la altitud respecto al nivel del mar, también es un factor que determina el índice de radiación UV. Esto debido a que en zonas de alta montaña, como los andes peruanos, el aire es más limpio y la capa atmosférica es más delgada. En promedio, por cada 1000 metros de incremento en altitud, la radiación UV incrementa entre un 10% a 12% (Benavides, 2010; Zaratti y Forno, 2003)

Las plantas expuestas a ambientes desfavorables, se encuentran sometidas a elevados niveles de estrés oxidativo. Para prevenir los daños de estos intermediarios tóxicos se activan los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los mecanismos no enzimáticos actúan el ácido ascórbico, uno de los compuestos antioxidantes hidrosolubles más abundantes, los carotenoides y flavonoides (Singh y Tuteja, 2010).

Uno de los mecanismos de adaptación a la radiación UV-B más documentados es el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides, los que se acumulan en las células de la epidermis y reducen el efecto deletéreo sobre distintos componentes celulares. Diversos autores hacen referencia al efecto de la radiación UV-B

sobre la síntesis de terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides (taninos y flavonoides) entre otros. Por otra parte, es sabido que una exposición a elevados niveles de radiación UV-B se relaciona con la generación de especies reactivas de oxígeno. Esto se traduce en transcripción de genes relacionados a la síntesis de flavonoides como respuesta fisiológica frente al daño que estos radicales libres ocasionan (Carrasco, 2009; Hollosy, 2011). Se han realizado estudios comparativos entre ecotipos antártico y andino de *Colabantus quitensis* (Clavelito antártico), siendo el ecotipo andino el que presenta una respuesta antioxidante más efectiva contra el UV-B. Esto significa un menor daño la membrana, así como un menor grado de foto activación (Navarrete *et al*, 2012).

2.4. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Los radicales libres más predominantes son el Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), aunque no son propiamente radicales libres, pueden llevar a la generación de radicales libres por otras reacciones químicas (Schoneich, 1999). Todos estos grupos químicos son referidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y tienen la habilidad de llevar a cabo el daño oxidativo en la célula (Elferink, 2000). Las ROS oxidan componentes celulares críticos como la membrana lipídica, las proteínas y el ADN, lo que conlleva a la inducción de apoptosis o necrosis (Miranda *et al.*, 2000; Bradford, 1976).

Las células han desarrollado mecanismos de defensa que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres con base en un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes. Los mecanismos moleculares de la adaptación celular a la hipoxia y al estrés oxidativo incluyen la activación de agentes antioxidantes (Bradford, 1976). Así cuando se incrementa la producción de los radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra- y extra- celular. Existen dos clases de antioxidantes: los endógenos, dotados por el propio sistema biológico, y los exógenos, aportados por la dieta (Velásquez, *et al.*, 2004; Leutner, 2001). Los antioxidantes endógenos son tanto enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y la catalasa) como no enzimáticos (ácido úrico, glutatión, bilirrubina, tioles, albúmina, factores nutricionales que incluyen vitaminas y polifenoles) (Schoneich, 1999; Esposito, *at al.*, 2002). En condiciones normales el mecanismo antioxidante endógeno mantiene en balance la producción de ROS (Schoneich, 1999). Tras la alteración de los mecanismos antioxidantes, se generan y

acumulan los radicales libres y se produce el estrés oxidativo que daña estructuras celulares, lo cual puede conducir a la muerte celular.

Diversas investigaciones han demostrado el rol potencial de los nutrientes antioxidantes en la terapéutica y prevención de diversas condiciones patológicas y fisiológicas como el envejecimiento (Schoneich, 1999; Velásquez, et al., 2004). También es conocido que uno de los principales agentes antioxidantes presentes en las plantas son los polifenoles, los cuales son producidos por los vegetales cuando son sometidos a estrés tal como el originado por altos niveles de radiación UV.

Los antioxidantes nutricionales actúan en diferentes compartimentos y a través de diferentes mecanismos como:

- 1) neutralizando directamente los radicales libres,
- 2) reduciendo la concentración de peróxidos y reparando las membranas oxidadas,
- 3) capturando el hierro y disminuyendo la producción de ROS,
- 4) neutralizando los ROS producidos por la vía de lipoperoxidación (Arzy, et al., 2005).

La dieta natural antioxidante incluye a la vitamina A, C y E, carotenoides, flavonoides y polifenoles (Esposito, et al., 2002; Hensley, et al., 2002; Miranda, et al., 2000; Harrison, et al., 2009). Diversas plantas han sido usadas en animales en modelos de daño oxidativo cerebral, con la finalidad de evaluar sus efectos protectores, así por ejemplo se estudió al *Panax ginseng* (Paxinos y Watson, 1998), el green tea (Barnes, 1979; Marklund y Marklund, 1974), *Azadirachta indica* (Riekkinen, et al., 1974), el *Fuling Baizhu* Danggui (FBD) (Pfeiffer, 2005), *Uncaria sinensis* (Ungerstedt, et al., 1970), *Ganoderma lucidum* (McGeer, et al., 1988), *Gynkgo biloba* (Butterfield, et al., 2002), todos los cuales presentaron efectos positivos.

2.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA NERVIOSO

El estrés oxidativo juega un rol muy importante durante los procesos fisiopatológicos que se producen en el sistema nervioso central (SNC), y el cerebro es especialmente vulnerable al daño oxidativo como resultado de su gran consumo de oxígeno, que alcanza el 20% del oxígeno consumido por todo el organismo, y por la abundante presencia de lípidos y la relativa disminución de enzimas antioxidantes comparadas con otros tejidos (Cui, et al.,

2004; Esposito, et al., 2002; Hensley, et al., 2002). Aunque los datos que se tienen son limitados, existen estudios epidemiológicos que indican que los hábitos en la dieta pueden influir en la incidencia de los desórdenes neurodegenerativos, como la demencia (incluida la enfermedad de Alzheimer) y el Parkinson (Esposito, et al., 2002; Bradford, 1976; Mello, et al., 2008).

El cerebro es accesible a diversos compuestos fitoquímicos que actúan contra el daño oxidativo provocado durante el envejecimiento o diversas patologías neurodegenerativas. Además el daño oxidativo puede ser provocado también durante períodos de hipoxia y reoxigenación, así los procesos adaptativos y patológicos desencadenados por la hipoxia dependen del balance en la actividad del sistema antioxidante (Leutner, et al., 2001). Así mismo, se ha reportado que la exposición temporal a la hipoxia en grandes alturas producen una reducción transitoria de la actividad del sistema nervioso autónomo y en el sistema nervioso central se refiere una serie de alteraciones cognitivas y del comportamiento (Blomgren, 2005; Arzy, et al., 2005).

El sistema inmune es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del tejido y para la respuesta a la infección y las lesiones. La Microglía, un tipo de células gliales, son los macrófagos que residen en el sistema nervioso central (SNC) y las principales células residentes inmunes en el cerebro, en donde constituyen la inmunidad innata (Carlini, 2003; OMS, 2002). En el cerebro normal, las células microgliales muestran ramificaciones, procesos muy móviles sometidas a ciclos de protrusión, extensión, y retracción lo que les permite controlar el microambiente local y detectar el daño del SNC. Las Microglías liberan factores que influyen en otro tipo de células gliales de apoyo, llamadas astrocitos, así como a las neuronas (Elferink, 2000; Schoneich, 1999).

En condiciones fisiológicas normales, la microglía esta desactivada y proporciona la inmunidad innata, liberando factores anti-inflamatorios y neurotróficos. En situaciones de estrés, incluyendo la invasión de patógenos, lesiones o la acumulación de proteínas anormales, las microglías proporcionan la respuesta inmune adaptativa, se activan y proporcionan así una respuesta inflamatoria que estimula el sistema inmunológico a eliminar el estímulo del estrés. En la mayoría de casos, la respuesta inflamatoria de las microglías es auto-controlada y se resuelve una vez que el estímulo de estrés se termina. La Inflamación innata crónica se ha reportado en la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de

Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y una serie de otras patologías del sistema nervioso (Velásquez, et al., 2004; Leutner, et al., 2001).

Estímulos inflamatorios puede tener efectos beneficiosos, tales como la fagocitosis de los restos y células apoptóticas e iniciar los procesos de reparación, pero la inflamación no controlada puede resultar en la producción de factores neurotóxicos que agravan la patología neurodegenerativa. La respuesta inflamatoria consiste en un delicado equilibrio entre el sistema inmunológico innato y adaptativo para hacer frente a estímulos inflamatorios. Como consecuencia de ello, los genes que son críticos para la amplificación de la respuesta inflamatoria son normalmente reprimidos en condiciones fisiológicas y sólo se induce cuando las células son sometidas a estrés (Blomgren, 2005; Arzy, et al., 2005).

Desde la última década, se han desarrollado agentes antiinflamatorios que pueden inhibir la activación microglial y prevenir la muerte neuronal. Tales agentes anti-inflamatorios son NSAIDs (drogas anti-inflamatoria no esteroideas, por sus siglas en inglés) (Cui, et al., 2004; Esposito, et al., 2002; Hensley, et al., 2002; Miranda, et al., 2000), tetraciclina de amplio espectro (Leutner, et al., 2001), colesterol bajo en estatinas (e.g., simvastatin, atorvastatin) (Blomgren, 2005), ligandos de estrógeno y de receptores canabinoides (Arzy, et al., 2005; Askew, 2002). Sin embargo, el uso prolongado de drogas es limitado debido a sus efectos colaterales, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes anti-inflamatorios con menos efectos adversos.

Estudios epidemiológicos proponen el uso de plantas medicinales como una alternativa de tratamiento a afecciones, que aún no tienen cura (Bradford, 1976; Mello, et al., 2008). Así por ejemplo, han demostrado que *Camelia sinensis* “té verde” y *Uncaria tomentosa* “uña de gato” presentan gran actividad antioxidante, además de actividad anti-cancerígena, anti-apoptótica y anti-inflamatoria (Harrison, et al., 2009; Paxinos & Watson, 1998), lo que indicaría la existencia de una relación muy estrecha entre la capacidad antioxidante y la actividad anti-inflamatoria de estas plantas (Harrison, et al., 2009; Barnes, 1979). Debido a ello, en países como Brasil, implementan una política en los municipios para el uso y consumo de plantas medicinales (Harrison, et al., 2009). Según Mello, et al (2008), las sustancias naturales que presentan probada acción antioxidante también se reportan como antiinflamatorias.

2.6. PATOLOGÍAS NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un déficit regional en el sistema colinérgico. La enfermedad del Alzheimer es un desorden degenerativo del sistema nervioso central que resulta en el deterioro de la función cognoscitiva, lo cual se evidencia en una pérdida de memoria e hipoactividad de proyecciones colinérgicas al hipocampo y al córtex. Por otra parte, las alucinaciones visuales experimentadas por sujetos con demencia (con presencia de cuerpos de Lewy) están asociadas con la reducción en la actividad neocortical relacionada al acetilcolinesterasa (AChE) (Perry et al, 1999; Silman y Sussman, 2005). Así mismo, se ha evidenciado que la sobreproducción de AChE en ratones induce a que estos muestren un déficit cognoscitivo y marcadores neuropatológicos típicos de estos trastornos neurodegenerativos (Soreq y Seidman, 2001). Debido a ello, diversos investigadores han establecido una relación entre la neurotransmisión colinérgica y el proceso de aprendizaje y memoria, funciones que se pierden con las patologías neurodegenerativas (Blokland, 1996).

En la neuropatología del Alzheimer y Parkinson se presentan cambios en concentración o propiedades de ciertas proteínas de adhesión celular como la glutactina, la neurotactina, la gliotactina y las neuroliginas, las cuales están relacionadas con dominios de la acetilcolinesterasa. El estudio post mortem de los cerebros de pacientes con Alzheimer revelan una pérdida neuronal y sináptica, así como la presencia de placas que contiene a la proteína β -amiloide y la tau fosforilada formando neurofilamentos. Es por ello que la función del sistema colinérgico está estrechamente relacionada con la patología del Parkinson (Sánchez y Salceda, 2008).

La inhibición de la acetilcolinesterasa incrementa la concentración sináptica de acetilcolina y permite elevados niveles de permanencia y una mayor duración en su receptor. Ratones transgénicos que sobre expresan la acetilcolinesterasa muestran un déficit cognitivo progresivo y marcadores neuropatológicos similares a los del Alzheimer (Soreq y Seidman, 2001). Inhibidores farmacológicos de la acetilcolinesterasa son importantes en el control de estas enfermedades que involucran daño en la neuro-transmisión mediada por acetilcolina (Soreq y Seidman, 2001). Algunos inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa son actualmente usada en el tratamiento sintomático de déficit cognitivo y daño en la memoria en la enfermedad del Alzheimer. Un mecanismo postulado es la restauración del déficit

colinérgico en la zona sináptica en el cerebro por la inhibición del metabolismo del acetilcolina (Thomsen et al, 1991). Se ha visto que algunos inhibidores de la acetilcolinesterasa juegan un papel doble en el contexto de la enfermedad del Alzheimer al inhibir la hidrólisis del acetilcolina y retardar el ensamblaje del péptido β de las fibras amiloideas (Silman y Sussman, 2005).

También se ha descrito que la butirilcolinesterasa tiene una función en el desarrollo y progreso de la enfermedad del Alzheimer. Esto es debido a que causa la producción de la proteína β -amiloide y ayuda a su difusión en las placas betas-amiloideas (Nese, 2003).

Por otra parte, la enfermedad del Alzheimer se puede definir por la acumulación de dos tipos de material fibroso: el péptido β -amiloide extracelular depositado en las placas seniles y las marañas neurofibrilares intracelulares compuestas de manera importante por la proteína tau anormal e hiperfosforilada. Así mismo, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y la concomitante pérdida de terminales nerviosas dopaminérgicas en el caudado-putamen. Estos factores pueden ser enfocados desde el análisis del estrés oxidativo (Angoa y Rivas, 2007).

2.7. ESTRÉS OXIDATIVO Y NEURODEGENERACIÓN

El estado de estrés oxidativo también juega un rol fundamental en la neuropatología de estas enfermedades. En estas enfermedades se observa oxidación de proteínas, lípidos, DNA e incluso RNA. Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno son generados por el metabolismo celular para la obtención de energía. A pesar de que los sistemas antioxidantes los eliminan para mantener un equilibrio de óxido-reducción, factores endógenos y exógenos pueden alterar este equilibrio. La oxidación de biomoléculas que conforma la membrana celular altera su permeabilidad, lo cual conduce a la pérdida del equilibrio osmótico y desencadena la producción de óxido nítrico; lo que estimula la producción de interleucinas inflamatorias, causando gliosis e incrementado el estado de estrés oxidativo con acumulación de cuerpos de Lewis (Angoa y Rivas, 2007).

Estudios de cerebro de ratones con edad avanzada revelan que estos poseen una elevada concentración de ROS y niveles más elevados de delección de ADN mitocondrial. Las

deleciones más comunes se dan en subunidades del complejo I y en el gen de la subunidad 3 del complejo IV (Cui et al., 2004).

Una gran variedad de plantas han evidenciado tener actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa a nivel in vitro. Diversos autores han reportado plantas pertenecientes a la familia fumariaceae, malvaceae, rutaceae, lameaceae, fabaceae entre otras que presentan este efecto. Esta función es atribuible a ciertos alcaloides esteroideos, indol alcaloides, flavonoides, xantonas, estilvenos entre otros compuestos (Mukherjee et al, 2007). De forma más específica, se ha analizado el efecto inhibitor de la acetilcolinesterasa por flavonoides tales como quercetina, quercetrina, y 3-metoxiquercetina (Jung y Park, 2007).

Se ha observado que los ROS pueden causar la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular. Esto lleva a la formación de aldehídos, de los cuales, el 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4-HNE) se ha visto relacionado con la apoptosis en células PC12. Por otra parte, los ROS también pueden causar la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). El NF- κ B en su forma inactiva se encuentra en el citoplasma; sin embargo, al activarse se trasloca al núcleo donde induce la transcripción de genes antiapoptótico, dentro de los cuales se encuentran los que codifican para la superóxido dismutasa (SOD). Se ha observado que este factor se ve activado por la activación de receptores de glutamato y por la despolarización de la membrana. Este factor es necesario para la apoptosis inducida por dopamina en las células PC12 (Esposito et al., 2002)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las hojas de *Lepidium meyenii* Walpers “Maca” fueron colectadas en el mes de agosto del 2015 en el distrito de Ramacancha (Latitud sur 11o9'23", Latitud norte 75o59'44") provincia de Junín, de la región Junín y procesadas en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal y Análisis Instrumental del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

3.2.1. Estabilización de la muestra

Las muestras de hojas seleccionadas fueron secadas a 40 °C durante 48 horas con cambios de posición de las plantas en una estufa de convección natural marca Binder, hasta alcanzar una humedad máxima de 15%. Posteriormente, las hojas secas fueron pulverizadas, cernidas en una zaranda de 600 µm de tamaño de poro y almacenadas en oscuridad con control de temperatura a 20°C hasta su análisis.

3.2.2. Obtención de los extractos

Se pesaron 10g de la muestra en polvo homogenizada, las cuales fueron colocados en un balón de 250 ml adicionándole 80ml de metanol ACS, dejándose en maceración por 20 horas. Posterior a ello, se sometió a reflujo durante 4 horas. La solución resultante se filtró al vacío con papel Whatman No 4 y se llevó a un volumen de 100mL con metanol ACS.

3.2.3. Tamizaje fitoquímico

3.2.3.1. Análisis de la Fracción A

5 ml del extracto metanólico inicial fueron separados para las pruebas de determinación de taninos, aminoácidos libres y flavonoides, tal como se detalla en el ANEXO 3.

3.2.3.2. Obtención de la Solución Ácida y la Fracción Insoluble

El resto del extracto metanólico (95ml) se colocó en un rotavapor a 40°C hasta evaporar todo el metanol. Luego se resuspendió la muestra con 30ml de HCl al 1% durante 90 minutos a 40°C y agitación constante. Finalmente, se filtró en papel Wathman N°4, obteniéndose la Fracción Insoluble (remanente en el papel filtro) y la Solución Ácida.

3.2.3.3. Tratamiento de la Fracción Insoluble

La fracción insoluble fue lavada con agua destilada y secado en estufa a 45°C por 2 días. Esta fracción se resuspendió en 10 ml de triclorometano para disolver el máximo posibles solutos adheridos. Se empleó un baño de ultrasonido a fin de facilitar la disolución. La disolución resultante se filtró y se agregó sulfato de sodio para retirar cualquier resto de agua. Finalmente, la solución se redujo a 5mL por evaporación, resultando en la Fracción B. Esta fracción fue evaluada para evidenciar la presencia de esteroides y quinonas.

3.2.3.4. Tratamiento de la Solución Ácida

La solución ácida obtenida previamente fue alcalinizada con amoníaco hasta llegar a un pH de 9-10 medido con cintas de pH Merck. Luego, se transfirió la solución a una pera de decantación de 250ml y se añadió 25ml de cloroformo. Posteriormente se agitó vigorosamente y se purgó los vapores deprendidos, para luego separar la fracción clorofórmica. El proceso se repitió, obteniéndose un total de 50 ml de fase clorofórmica.

3.2.3.5. Tratamiento de la Fase Clorofórmica

La fase clorofórmica fue lavada con 15 ml de agua destilada dos veces. La fase acuosa resultante se combinó con la solución remanente del paso anterior. Finalmente la fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró para obtener la Fracción C. Esta fracción fue evaluada para la presencia de Cardenólidos, esteroides y alcaloides.

3.2.3.6. Tratamiento de la Fase Acuosa

Se saturó la solución con sulfato de sodio anhidro (0.1 g de sal por cada ml de solución), se filtró y transfirió a una pera de decantación de 250ml. Luego se realizaron dos extracciones con 25 ml de una solución de triclorometano/etanol (3:2) (v/v) y se recuperó y almacenó la fase orgánica. Como resultado de esta separación se obtuvo la fase acuosa, denominada Fracción E y la fase orgánica. La fracción E pasó por pruebas cualitativas para la determinación de flavonoides y Leucoantocianidinas.

3.2.3.7. Obtención de la Fracción D

La fase orgánica se lavó con 10 ml de una solución de sulfato sódico al 5%, la cual fue descartada. Posterior a ello, se secó con sulfato sódico anhidro y se filtró para obtener la Fracción D, a la cual se le hicieron pruebas para el análisis de flavonoides, Leucoantocianidinas, Cardenólidos, alcaloides esteroides y Triterpenos.

3.3. ANALISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical ABTS^{•+} es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable. A pesar de esto, los valores de actividad antioxidante son dependientes de las condiciones empleadas en el análisis, por lo que los valores son referenciales.

El análisis de la capacidad antioxidante se realizó por el método ABTS reportado por Arnao *et al* (2001) con algunas modificaciones. Este método se fundamenta en la decoloración natural de un radical libre ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) preformado, la cual se ve disminuida en presencia de un antioxidante. Este método es aplicable para antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

La solución de ABTS se preparó como se indica en el ANEXO 4. Esta solución se diluyó en metanol al 80% hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 a una λ de 734 nm.

Para preparar la curva de calibración se pesaron 0.02503g del antioxidante Trolox y se añadió metanol (80%) hasta aforo a 100ml, obteniéndose una solución madre 1000 μ M. A partir de la solución madre de Trolox se prepararon soluciones a 100, 200, 300, 400 y 500 μ M.

Para preparar los tubos de reacción, se adicionó 150 μ L de la muestra, solución estándar o metanol (blanco) a medir y se adicionó 2850 μ L del radical ABTS. La reacción transcurre a temperatura ambiente por un tiempo 30 minutos, al cabo del cual se midió la absorbancia a 734 nm. Para los análisis de la fase lipofílica se siguieron los mismos pasos, cambiando el solvente metanol por diclorometano.

3.4. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Para la determinación de compuestos fenólicos totales se prepararon previamente las soluciones de carbonato de sodio (1N) y Folin Ciocalteu (1N).

Para realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos, para cada muestra se tomaron alícuotas de 500µl, a las cuales se adicionó 250 µl del reactivo de Folin Ciocalteu (1N), 8.25 ml de agua destilada y 1000 µl de carbonato de sodio (1N), los tubos fueron agitados en un vortex, se mantuvo en incubación por 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. Al mismo tiempo se realizó la preparación de un blanco con metanol 80% en lugar de la muestra y se trabajó bajo las mismas condiciones que las muestras, las lecturas se realizaron a una λ de 755 nm.

El contenido de compuestos fenólicos se calculó utilizando la ecuación de la curva estándar de ácido gálico: $Y = 0.0103 X + 0.00$, los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (AG)/100g de muestra.

3.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR GC-MS

El ensayo se realizó por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS). Para ello se tomaron 50 µl del extracto metanólico mezclándose 450 µl de metanol HPLC transfiriéndose a un vial de 2ml para GC. El análisis se realizó en un GC Agilent technologies 7890A GC System –Inert XL EI/CI MSD 5975C whit Triple- Axis Detector Agilent technologies GC Sampler 120, columna capilar HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox 30m x 250µm x 0.25µm y un sistema de datos HP Chem Station. La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) a 4°C/min, luego se incrementó hasta 250°C (5 min) a 5°C/min, finalmente, la temperatura aumenta a 10°C/min, hasta alcanzar 275°C (15 min). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C, respectivamente. El gas de arrastre empleado fue helio (99.995%).

Los espectros de masas y corriente iónicas reconstruidas se obtuvieron por medio de barrido automático de frecuencia (full scan), a 4.75 scan s⁻¹, en el rango de masas m/z 30-450. La identificación de los compuestos se hizo mediante la comparación entre los espectro de masas de los picos cromatográficos identificados para cada muestra y los encontrados en las bases de datos o librerías (Data base \NIST08.L, Database\W8.L)

3.6. EFECTO NEUROBIOLÓGICO SOBRE CELULAS PC12

Las células PC12 fueron aisladas de cerebro de rata con una edad de entre 7 y 14 días de nacidas. Estas fueron colocadas en una incubadora con 5% CO₂ a 37 °C en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 5% de suero de caballo y 5% de suero fetal bovino y antibióticos Pen-Step (100 U/ ml). El crecimiento inicial fue realizado el frasco flaks T-75 con adherente, hasta lograr una confluencia del 80%. Luego las células fueron disgregadas y pasadas a microplacas de 96 pocillos con adherente, con una densidad de 1x10⁵ cel/ml, incubándose toda una noche para lograr su adherencia a los pocillos.

Las células PC12 fueron tratadas con 3 diferentes concentraciones de extracto metanólico, 2, 5 y 10 µg durante 6 y 12 horas. Posteriormente las células pre tratadas fueron inducidas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a 100µM o con 200µM de Nitroprusiato de Sodio (NPS), durante 12 y 24 horas, respectivamente.

El grupo control negativo fueron las células PC12 solo con medio DMEM, y el grupo control positivo fueron las células PC12 tratadas solo con 6-OHDA o NPS.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada dosis o tiempo de incubación en el Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.6.1. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Se aplicó el método de ensayo 3-(4,5 Dimetilthiazol-2)-2,5 difeniltetrazolio bromide (MTT) para evaluar el efecto citotóxico de 6-OHDA sobre células PC12 pre-tratadas con las diferentes concentraciones del extracto metanólico. El fundamento de la reacción se da en la mitocondria de células viables por el cambio de coloración del tetrazole amarillo que es reducido a un compuesto insoluble purpura (precipitado) conocido como formazan dentro de la mitocondria de células.

Luego del pre-tratamiento y la inducción con la 6 OHDA por 12 horas, se agregó a cada pocillo 20 µl de solución MTT (0,25%) y se incubo por 4 horas a 37 °C. Luego se realizó la solubilización del formazan con 150 µL de DMSO y la solución coloreada fue cuantificada

usando un lector de placas a una longitud de onda de 570nm. Los datos de la viabilidad celular son expresados como porcentaje con respecto a las células del grupo control negativo.

3.6.2. DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR

La citotoxicidad fue cuantificada por la medición de la actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de las células dañadas en el medio de cultivo. Luego del tratamiento de las PC12, las células fueron tratadas con 0,5% de Tritón X-100, todo el medio fue centrifugado y el sobrenadante fue usado para la determinación de la actividad de LDH por espectrofotometría a 440nm según instrucción del kit LDH cytotoxicity assay kit II (Abcam). La LDH fue expresada como porcentaje de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ LDH} = (\text{LDH del medio DMEN/LDH total}) \times 100.$$

3.6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA

Se determinó la actividad de SOD por medio de un kit (Superoxide dismutase activity colorimetric Assay kit, Abcam) sensible que usa WST-1 para producir un compuesto formazan soluble en agua debido a la reducción con un anión superóxido. La SOD fue determinada de una curva estándar y expresada en U/ml.

3.6.4. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE OXIDO NITRICO

La liberación de Óxido Nítrico (NO) producido por la exposición al Nitroprusiato de sodio (NPS) fue estimado espectrofotométricamente por la medición de nitrito. Luego de 24 horas de tratamiento con NPS a 200 μM , se tomó 100 μl del medio de cultivo y se incubó con 100 μl del reactivo de Griess al 1%, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia de la reacción colorimétrica fue medida a 540nm usando un lector de placas. El contenido de nitrito fue calculado basado en una curva de calibración construida con nitrito de sodio, y fue expresada en $\mu\text{g/ml}$.

3.7. ANÁLISIS ESTADISTICO

Los efectos neurobiológicos se correlacionaron con el tiempo de pre-tratamiento y la dosis de extracto aplicada. Para ello se empleó el software Minitab 17 ®.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

La presencia de compuestos fenólicos se evidencia con los resultados positivos en las pruebas de flavonoides y taninos en las reacciones con el reactivo de Shinoda, tricloruro férrico, respectivamente. Así mismo, en la fracción E (acuosa), la respuesta positiva al reactivo de Shinoda fue mayor. Otro resultados interesante es la presencia de terpenos y esteroides en las fracciones B y C. Resultados registrados en la tabla 3.

TABLA 3: Análisis fitoquímico del extracto foliar de *Lepidium meyenii*

| FRACCION | REACCION | RESULTADO |
|----------|-------------------------|-----------|
| A | Rvo. Ninhidrina | +++ |
| | Rvo. Gelatina | + |
| | Rvo. Tricloruro Férrico | + |
| | Rvo. Shinoda | + |
| B | Rvo. Libermann Burchard | ++ |
| | Rvo. Borntrager | - |
| C | Rvo. Kedde | + |
| | Rvo. Libermann Burchard | +++ |
| | Rvo. Mayer | + |
| | Rvo. Dragendorff | + |
| | Rvo. Scott | - |
| D | Rvo. Shinoda | - |
| | Rvo. Rosenheim | - |
| | Rvo. Kedde | - |
| | Rvo. Libermann Burchard | - |
| | Rvo. Mayer | + |
| E | Rvo. Shinoda | ++ |
| | Rvo. Rosenheim | - |

Convenciones: (-) negativo, (+) escaso, (++) observable, (+++) abundante

Este análisis nos permitió evidenciar la presencia moderada y abundante de moléculas involucradas en la actividad antioxidante (fenoles, flavonoides y terpenos) en las fracciones A, B, C y E. Castañeda et al., (2010) corrobora la presencia de flavonoides tales como quercetina, en las hojas de maca. La presencia de estos compuestos está relacionada con la actividad antioxidante

4.2. ANALISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS se han expresado en equivalentes Trolox (TEAC) y se muestran en la figura 5. Los valores de TEAC para las diferentes fracciones evaluadas van desde 74.33 en la fracción clorofórmica, hasta 2262.37 en la fracción metanólica.

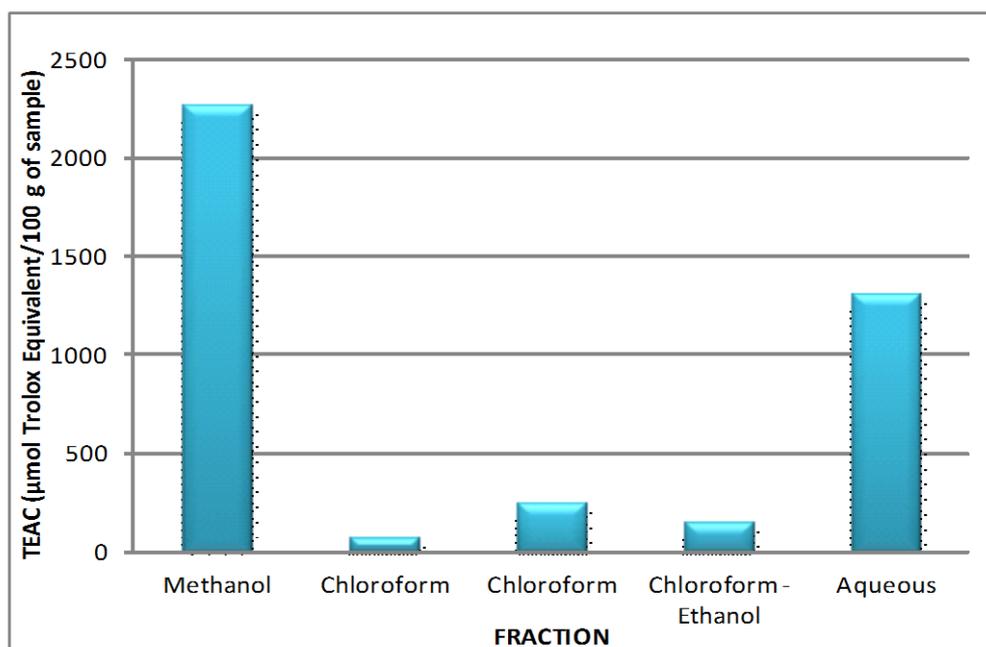


FIGURA 5: Capacidad antioxidante de las fracciones del extracto foliar metanólico de *Lepidium meyenii* por el método ABTS

Los resultados observados en la figura 5 nos muestran valores elevados de actividad antioxidante en las fracciones metanólica y acuosa. Considerando los diferentes disolventes aplicados, el extracto clorofórmico presenta los menores valores de actividad antioxidante. Como puede observarse, estos resultados guardan relación con los resultados de la marcha fitoquímica donde la presencia de flavonoides fue positiva.

Por otra parte, Berlowski, *et al.* (2013), trabajo con extractos acuosos al 1% (w/v), donde reportó una capacidad antioxidante de 37 µmol TEAC/100g de muestra. Estos resultados son superiores en proporción a los hallados en el presente trabajo. Esto puede deberse a una saturación del solvente de extracción.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles totales muestran un contenido de 738 mg AG/100 g de muestra seca. Berlowski, *et al.* (2013) reportó 4.6 mg AG/100 ml de extracto acuoso al 1% de hipocótilo de maca. Debido a ello, se puede afirmar que el extracto metanólico trabajado presenta un contenido superior de fenoles totales expresados como equivalente de Ácido Gálico, frente a lo reportado por otros autores en el extracto acuoso de hipocótilo.

4.4. DETERMINACION DE COMPUESTOS POR GC-MS

El extracto metanólico (Fracción A) fue analizado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), según la metodología descrita. Como criterio de evaluación solo se consideraron los picos que un área relevante en comparación con el resto. Mediante el análisis cromatográfico se logró identificar la presencia de tres compuestos con tiempo de retención de 25.565, 26.634 y 30.495 minutos.

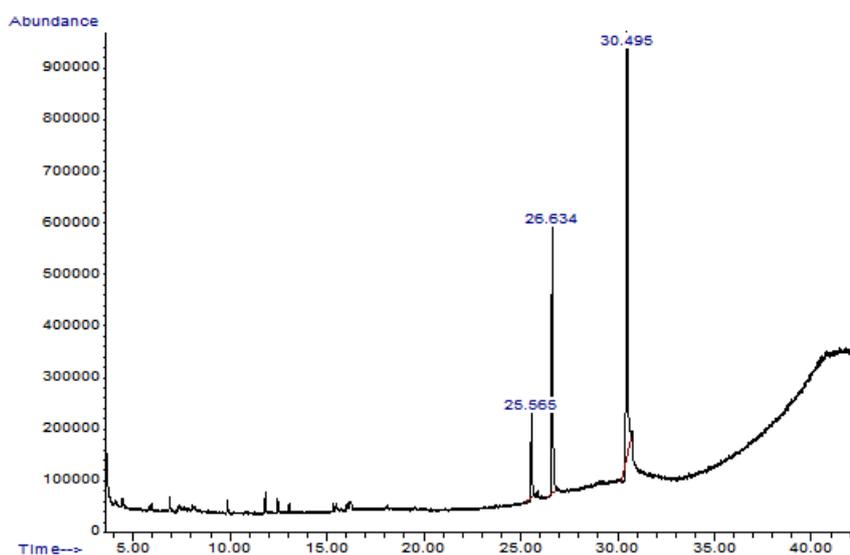
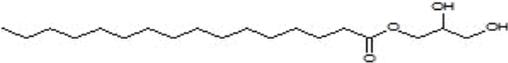
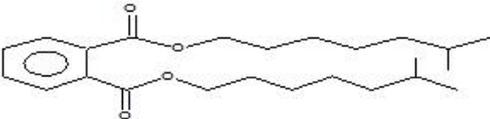
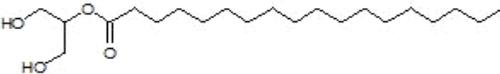


FIGURA 6: Cromatograma del extracto metanólico de hojas de *Lepidium meyenii*

El análisis del espectro de masas de estos picos nos permitió identificar los compuestos que se muestran en la tabla 4. La actividad biológica de estos compuestos ha sido reportada por

diversos autores. Al primer compuesto identificado se le atribuyen propiedades antioxidantes, hemolíticas y pesticidas; al segundo se le atribuyen propiedades antimicrobianas; mientras que al tercero se le atribuyen propiedades antioxidantes, entre otras (Gnanavel y Saral, 2013; Gopinath *et al.*, 2013)

TABLA 4: Compuestos mayoritarios en el extracto metanólico de hojas de *Lepidium meyenii* detectados por GC-MS

| Tiempo de retención (min) | Nombre | Estructura Química |
|---------------------------|---|--|
| 25.565 | Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester |  |
| 26.634 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester |  |
| 30.495 | Octadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester |  |

4.5. EFECTO NEUROPROTECTOR SOBRE CÉLULAS PC12

Las células PC12 son utilizadas frecuentemente en la investigación de la enfermedad de Parkinson. Estas células son conocidas por secretar altas cantidades de dopamina, por ello esta línea celular derivado de feocromocitoma de rata es utilizada en estudios in vitro como modelo de toxicidad neuronal para evaluar drogas en las neuronas dopaminérgicas.

El estrés oxidativo contribuye a la cascada patogénica que lleva a la degeneración y muerte neuronal en diversas enfermedades neurodegenerativas. La inducción de proteínas antioxidantes endógenas por antioxidantes parece ser una estrategia razonable para disminuir la progresión de este tipo de enfermedades.

4.5.1. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

Tal como se muestra en la figura 7, el pre tratamiento con el extracto metanólico de maca mostro un incremento significativo en la viabilidad celular frente al daño causado por la 6-

OHDA. La 6-OHDA produjo un incremento de la muerte celular a 100 μ M (56%) en comparación con el grupo control. Bajo estas condiciones, la viabilidad celular fue más alta al aplicar 10 μ g de extracto acuoso de hojas de maca al emplear 6 y 12 horas de incubación, con porcentajes de 72.7% y 85.0%, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que el pre-tratamiento con Maca podría activar mecanismos antioxidantes en las células PC12, los que fueron capaces de proteger a las células de los cambios neurodegenerativos.

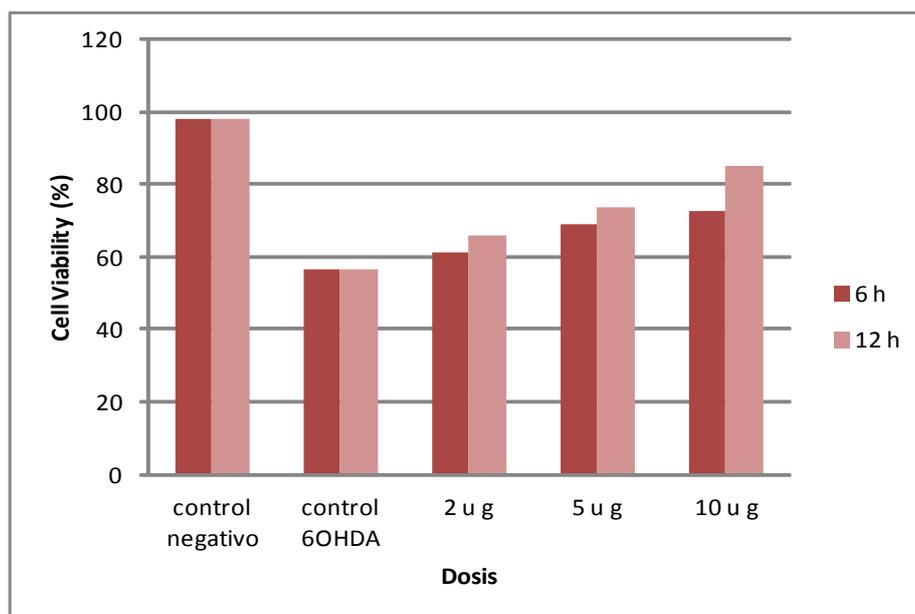


FIGURA 7: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la Viabilidad Celular

4.5.2. DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR

La LDH es una enzima citoplasmática estable en la mayoría de células que es rápidamente liberada cuando hay daño en la membrana plasmática, por ello un incremento en el daño de membrana o muerte celular resulta en un incremento de la actividad de la LDH en los medios de cultivo celular.

Cuando las células PC12 fueron incubadas con 6-OHDA durante 12 horas, el porcentaje de LDH liberada se incrementó de 12% (control) a 54.7%. El pre-tratamiento con extracto acuoso de maca en las células PC12 tratadas con 6-OHDA produjo una reducción significativa de la actividad de LDH liberada por las células, siendo el porcentaje de reducción de LDH directamente proporcional a la concentración del extracto (2 μ g: 43,6%; 5 μ g: 34,3% y 10 μ g: 29,3% durante 6 horas) y dependiente del tiempo de tratamiento (2 μ g:

39,3%, 5ug: 29,0%; 10ug: 22,3% durante 12 horas), tal como se puede observar en la figura 8.

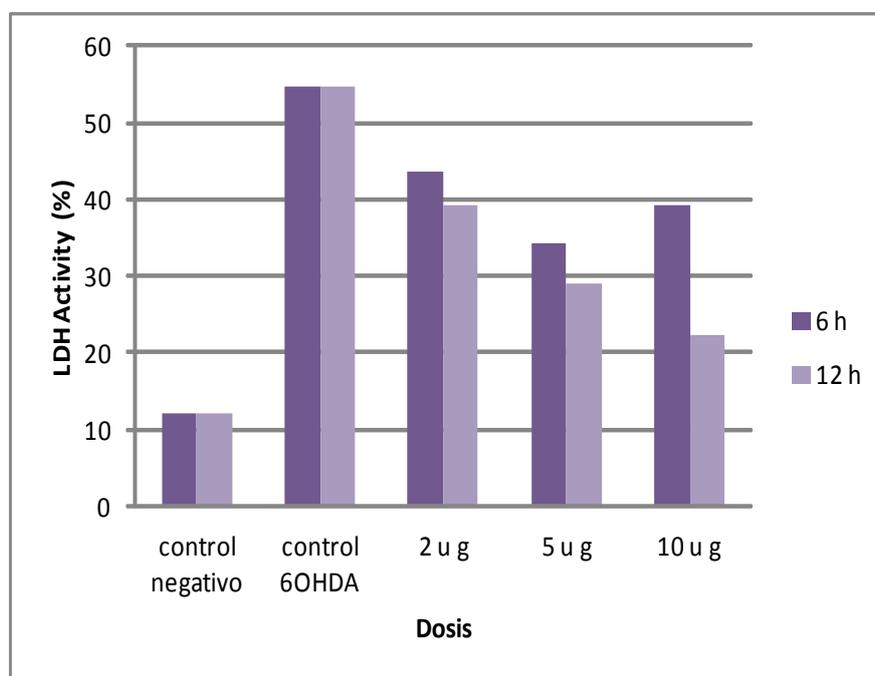


FIGURA 8: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la Citotoxicidad

4.5.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA

Los radicales libres generados por la 6-OHDA causan daño por lipoperoxidación de la membrana y alteración en las proteínas del cito esqueleto, además de inhibir la cadena de respiración mitocondrial, específicamente los complejos I y IV. Un mecanismo de defensa celular para compensar el estado de estrés oxidativo es dado por las enzimas antioxidantes endógenas, de las cuales la Superóxido Dismutasa (SOD) es una de las más importantes y abundantes en las células PC12.

Los niveles de SOD fueron disminuidos en las células PC12 tratadas con 6-OHDA (0.6 U/ml). El pre-tratamiento con extracto acuoso de Maca produjo un incremento significativo de la actividad de SOD a 5ug y 10ug (2,4 y 3,7 U/ml respectivamente) a las 6 horas de incubación, tal como se muestra en la figura 9. No se encontró diferencias significativas al evaluar un mayor tiempo de pre-tratamiento.

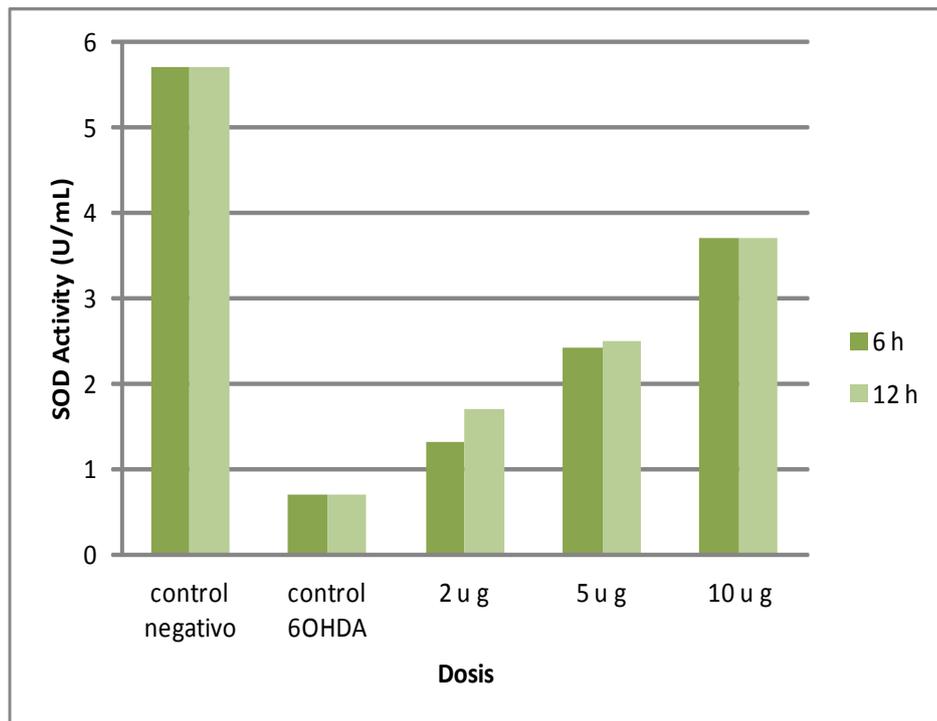


FIGURA 9: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la Actividad de la Superóxido Dismutasa

4.5.4. DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO

El daño neuronal inducido por el Nitroprusiato de sodio (NPS) se debe principalmente a la producción de radicales libres como el Óxido nítrico, peroxinitrito y otras especies reactivas de nitrógeno. Los excesivos niveles de Óxido nítrico llevan a estrés oxidativo a las neuronas y su posterior daño o muerte celular. Los resultados de la figura 10 muestran que la exposición de las células PC12 al NPS produjo un incremento del nitrito, indicador de óxido nítrico, con respecto al grupo control (3,4ug/ml y 0,7ug/ml respectivamente). El pre-tratamiento con extracto de maca disminuyó significativamente la concentración de nitrito de 3.4 a 2.4 2ug/ml durante 6 horas de incubación a una dosis de extracto de 10 µg, reduciéndose aún más dichos niveles a las 12 horas de incubación. El pre-tratamiento a 2ug de extracto de maca no produjo una reducción significativa en los niveles de nitrito, en ambos tiempos de incubación. Tal como se muestra en la figura 10.

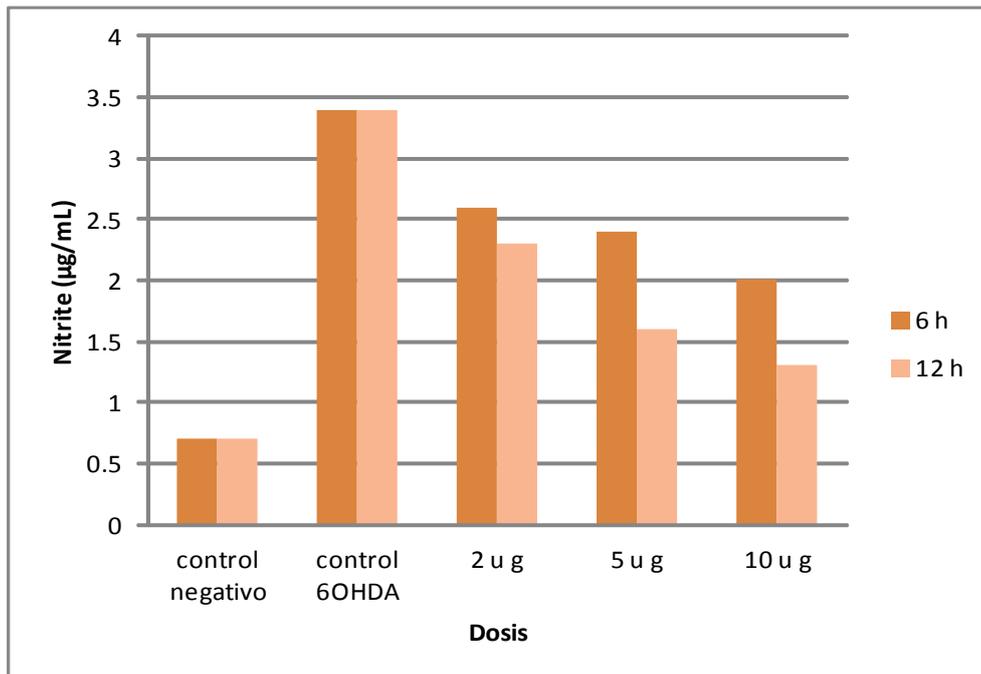


FIGURA 10: Efecto de la dosis y el tiempo de pre-incubación en la liberación de Óxido Nítrico

V. CONCLUSIONES

- Los resultados mostrados nos permiten evidenciar en el extracto de hojas de maca la presencia de principales grupos de metabolitos secundarios tales como flavonoides, taninos y demás compuestos fenólicos, asumiéndose que el efecto neurobiológico mostrado está relacionado con la capacidad antioxidante de estos compuestos y el elevado contenido de fenoles totales encontrado.
- El incremento de la viabilidad celular y reducción de la citotoxicidad frente a estrés oxidativo generado por la 6-OHDA a una concentración de 100 μ M demuestra el efecto neurobiológico *in vitro* de protección antioxidante del extracto foliar metanólico de *Lepidium meyenii*.
- Así mismo, se propone que los mecanismos que explican esta acción son la potenciación del mecanismo enzimático de balance óxido-reducción, a través del incremento de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa; y la captación directa de radicales libres, como el óxido nítrico.
- A un nivel de significación del 5%, podemos afirmar que el 89.06% de la variabilidad en el porcentaje de células viables, que el 85.01% de la variabilidad en el porcentaje de LDH, es explicada por el tiempo de exposición y la dosis aplicada del extracto foliar. Así mismo, dentro del rango de dosis y tiempo de pre-tratamiento estudiado, se puede afirmar que existe una relación positiva entre estas dos variables y el porcentaje de células viables.
- De igual manera, a un nivel de significación del 5%, podemos afirmar que el 85.01% de la variabilidad en el porcentaje de LDH se explica por el tiempo de exposición y la dosis aplicada del extracto foliar. Siendo en este caso una relacionadas de forma inversamente proporcional la que relaciona ambas variables con la variable respuesta.

- En el caso del análisis de la actividad de SOD, con un nivel de significación del 5%, la variabilidad se encuentra explicada en un 97.34% por el tiempo de exposición y la dosis aplicada. Existiendo una relación positiva frente al incremento de tiempo de pre-tratamiento y la dosis
- Finalmente, con un nivel de significación de 5%, la variación en concentración de ON se encuentra explicada en un 78.82% a las dos variables analizadas.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos a nivel *in vivo* que permitan evaluar biodisponibilidad de los principales compuestos bioactivos encontrados en el extracto metanólico de maca en el organismo. Esto, con la finalidad de evaluar su aplicación como coadyuvante en formulaciones nutracéuticas que permitan prevenir, retrasar o detener el proceso neurodegenerativo de enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aliaga, R. 1999. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la maca *Lepidium meyenii* Walpers. Convenio Andrés Bello. Santa Fe, Colombia. 50 pp.
2. Álvarez, C. 1993. Utilización de diferentes niveles de maca en la fertilidad de cobayos. Tesis. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Facultad de Ciencias Agrícolas, Cerro de Pasco, Perú.
3. Alzamora, L; Álvarez, E; Torres, D; Solís, H; Colona, E; Quispe, J; Chanco, M. 2007. Efecto de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre la producción de óxido nítrico in vitro. Revista Peruana de Biología (Número Especial) 13(3): 215-217.
4. Alzamora, L; Colona, E; Acero de Mesa, N; Galán de Mera, A; Muñoz Mingarro, D; Linares, F; Domínguez, MT; Álvarez, E. 2007. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. Revista Peruana de Biología (Número Especial) 13(3): 207-209.
5. Alzamora, L; Galván, P; Álvarez, E; Torres, D; Colona, E; Aliaga, M; Marcelo, A. 2007. Producción de IFN- γ Inducida por los Extractos Metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). Revista Peruana de Biología (Número Especial) 13(3): 207-209.
6. Alzamora, L; Solís, H; Rojas, M; Calderón, M; Fajardo, N; Quispe, J; Álvarez, E; Colona, E; Torres, D. 2007. Actividad Leishmanicida de los Extractos Metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium meyenii*, Chacón (Brassicaceae). Revista Peruana de Biología (Número Especial) 13(3): 211-214.
7. Alzheimer's Disease International (ADI). 2015. Informe Mundial sobre el Alzheimer 2015. Londres – Inglaterra. 22 p.

8. Angoa Pérez, M; Rivas Arancibia, S. 2007. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. Arch. Neurocién. 12(1): 45-54.
9. Arias R, AR. 2002. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón, “Maca”. Tesis Blgo. Lima – Perú. 90 p.
10. Arnao, MB; Cano, A; Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry 73: 239–244
11. Arroyo Acevedo, J. y Sandoval de Arroyo, S. 1997. Inocuidad de la maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) con respecto a la DL50. Sección Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
12. Arzy S. y col. 2005. Why revelations have occurred on mountains? Linking mystical experiences and cognitive neuroscience. Medical Hypotheses 68(5): 841-845.
13. Askew E. 2002. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. Toxicology 180(2): 107-119.
14. Barnes, CA. 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J Comp Physiol Psychol. 93(1):74-104
15. Bastianetto S. y col. 2002. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. Neurobiology Aging. 23: 891-897.
16. Beltrán, H; Baldeón, S; Carrillo, E; Fuertes, C; Arroyo, J; Sandoval, S; Obregón, L. 1998. Estudio botánico y clínico de los ecotipos amarillo y morado de *Lepidium peruvianum*: maca. Evaluación de su toxicidad aguda. 143-144 p.
17. Benavides Ballesteros, HO. 2010. Información Técnica sobre la Radiación Ultravioleta, el índice UV y su pronóstico. Documento de respaldo a la información de la página web del IDEAM. Febrero 2010. IDEAM-METEO/001-2010.
18. Berlowski, A; Zawada, K; Wawer, I; Paradowska, K. 2013. Antioxidant Properties of medicinal Plants from Peru. Food and Nutrition Sciences 4:71-77.

19. Bloklan, A. 1996. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory?. *Brain Research reviews* 21: 285-300.
20. Blomgren K. 2005. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radical Biology Medicine*. 2005: 1-10.
21. Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 1995; 28:25-30
23. Butterfield D. y col. 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Nutritional Biochemistry* 13: 444-461.
24. Carlini E. 2003. Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 75: 501-512.
25. Carrasco Ríos, L. 2009. Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *IDESIA (CL)* 27(3): 59-76.
26. Castañeda, B; Loja, B; Puebla, P; Gamarra, F; Alvarado, A; Muñoz, A; Enríques Valencia, Ibáñez, L. 2010. Estudio Botánico y Fitoquímico de las Hojas Secas de Maca de la Meseta de Bombón, Junín-Perú. *Revista Horizonte Médico*. 10(1): 13-22.
27. Castaño, M. 2008. Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón): composición química y propiedades farmacológicas. Fundación Instituto Suramericano de Plantas Medicinales (FISPLAME). Bogotá-Colombia. *Rev. Fitoterapia*; 8(1): 21-28.
28. Chacón Roldán, G. 1961. Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 43 pp.
29. Cikutovic M; Cikutovic P. 2005. Plantas Altoandinas y su Efecto Sobre la Fertilidad: ¿mito o realidad?. *Ciencia & Trabajo* 7(16): 41-48.

30. Cosio, EG; Esparza, E. 2010. Metodología analítica para la cuantificación de compuestos bioactivos en *Lepidium meyenii* con el fin de potenciar su oferta para exportación. Perúbiodiverso. Lima, Perú. 64 p.
31. Cui K. y col. 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. Prog. Neuro-Psychopharmacology Bio. Psychiatry 28: 771-779.
32. Custodio, N; García, A; Montesinos, R; Escobar, J; Bendezú, L. 2008. Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú 237 Anales de la Facultad de medicina. 69(4):233-8
33. D'Arrigo, G; Benavides, V; Pino, J. 2004. Evaluación preliminar del efecto de *Lepidium meyenii* Walp en el desarrollo embrionario de ratón. Rev Per Biol; 11 (1): 103-6.
34. Elferink J. 2000. Desórdenes mentales entre los incas del antiguo Perú. Revista Neuro-Psiquiatría 1(2): 3-18.
35. Escudero H, A. 2014. Estudio del papel de MCP-1 en los mecanismos neuroprotectores de la noradrenalina. Tesis Dr. Madrid - España, Universidad Complutense de Madrid. 156 p.
36. Esparza, E. 2012. Optimización del contenido de compuestos bioactivos en maca durante su proceso productivo industrial. Laboratorio de Bioanalítica, sección química. Pontificia Universidad Católica del Perú - Congreso Centro Nacional de Planeamiento Estratégico (CEPLAN). Lima, Perú.
37. Esposito E, y col. 2002. A review of specific dietary antioxidant and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. Neurobiology Aging 23: 719-735
38. Gnanavel, V; Saral, AM. 2013. GC-MS analysis of petroleum ether and ethanol leaf extracts from *Abrus precatorius* Linn. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 4(3): 37-44.

39. Gonzales, FG., Ruiz-Luna, AC., Salazar, S., Aspajo, NJ., Rubio, J., Gasco, M. 2005. *Lepidium meyenii* (Maca) increases litter size in normal adult female mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3:16.
40. Gonzales, GF. 2012. *Ethnobiology and Ethnopharmacology of Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. Hindawi Publishing Corporation *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. V. 2012. 10 p.
41. Gopinath, S; Sakthidevi, G; Muthukumaraswamy, S; Mohan, VR. 2013. GC-MS Analysis of bioactive constituents of *Hypericum mysorense* (Hypericaceae). *Journal of Current Chemical & Pharmaceutical Sciences*. 3(1): 6-15.
42. Harrison, F; Hosseini, A; Mc Donald, M. 2009. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*. 198(1): 247-251.
43. Hensley K. y col. 2002. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Archives Biochemistry Biophysics* 397(2): 377-383.
44. Hollósy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
45. Hopkins, W. 1999. *Introduction to Plant Physiology*. 2nd Ed. John Wiley & Sons. New York.
46. Ibañez, L; Castañeda, B; Castro de la Mata, R; Manrique, R. 2007. Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers, “MACA” y *Lupinus mutabilis* Sweet, “CHOCHO” en ratas: METABOLIC EFFECTS OF LIPIDIUM MEYENII WALPERS “MACA” AND LUPINUS MUTABILIS SWEET, “CHOCHO” IN RATS. *Revista Horizonte Médico*. V 7, N° 1 p. 32-38.
47. Illescas, Ma.G. 1994. Estudio químico y fitoquímico comparativo de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp “maca” procedente de Carhuamayo (Junín). Trabajo de Aptitud Profesional para optar el título de Químico Farmacéutico, Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

48. Jerí, H. 1999. Evaluación nutricional. En: Manual técnico de producción de maca. Agronegocios. N° 4, Lima, Perú. pp 108-117.
49. Johns, T. 1980. Ethnobotany and phytochemistry of *Tropaeolum tuberosum* and *Lepidium meyenii* from Andean South-America. MSc. Thesis, Univ. of British Columbia, England, 113 p.
50. Jung, M; Park, M. 2007. Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12: 2130-21139.
51. Karamac, M; Kosinska, A; Rybarczyk, A; Pegg, RB. 2007. Chromatographic separation of phenolic compounds from rapessed by SE-HPLC- a short report. *Polish Journal of food and nutrition Sciences* 57(1): 87-90.
52. Khoddami, A; Wilkes, MA; Roberts, TH. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 18: 2328-2375.
53. Kumar, S; Pandey, AK. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013: ID 162750 – 16p.
54. Lama, G., Quispe, G., Ramos, D., Ferreyra, C., Casas, H. and Apumayta, U.1994. Estudio de la propiedad estrogénica del *Lepidium meyenii* Walp (maca) en ratas. En: Resúmenes de los trabajos, II Congreso Nacional de Ciencias Farmacéutica y Bioquímicas “Marco Antonio Garrido Malo”, 17-21 octubre de 1994. Lima, Perú. p. 73.
55. Leutner, S and col.2001.ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm.*108: 955- 967.
56. Li, G., Ammermann, U. y Quirós, C. 2001. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 55(2): 255-262.
57. Llibre Rodríguez, J; Gutiérrez Herrera, RF. 2014. Demencias y enfermedades de Alzheimer en América Latina y el Caribe. *Revista Cubana de Salud Pública* 40(3): 378-387.

58. Lock de Ugaz, O. Investigación Fitoquímica: método en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. PUEP. Lima.
59. López-Fando, A; Gómez-Serranillos MP; Iglesias, I; Lock O; Upamayta, UP; Carretero, ME. 2004. *Lepidium peruvianum* Chacón restores homeostasis impaired by restraint stress. *Phytotherapy Research*. 18. 471-474.
60. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem*. 47: 469-474.
61. McGeer, PL; Itagaki, S; Boyes, BE; McGeer, EG. 1988. Reactive microglia and its expression of substance P are positive for HLADR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285–1291.
62. Mello P, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo L. 2008. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc*. 80(2):301-309
63. Meza E. 1995. Efectos de la maca (*Lepidium meyenii* Walp.) sobre los parámetros productivos y reproductivos de cuyes raza Wanka. Tesis, Universidad Nacional del Centro del Perú. Facultad de Zootecnia. Huancayo, Perú.
64. Miranda S. y col. 2000. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 62(6): 633-648.
65. Miura, T., Hayashi, M., Naito, Y., Suzuki, I. 1999. Antihypoglycemic effect of maca in fasted and insulin-induced hypoglycemic mice. *Journal of Traditional Medicine* 16, 93-96.
66. Montoya C, J. 1999. Manual del cuidador primario: Enfermedad del Alzheimer y otras demencias relacionadas. Club Alzheimer. Medellín – Colombia. 200 p.
67. Moreno, J. 1995. Maca (*Lepidium meyenii* Walp): Recurso genético patrimonio del Perú para la humanidad. *Agroindustriales de Productos Andinos*. Lima, Perú. 79 pp.

68. Muhammad, I., Zhao, J., Dunbar, D. and Khan, I. 2002. Constituents of *Lepidium meyenii* “maca”. *Phytochemistry* 59: 105-110.
69. Mukherjee, PK; Kuan, V; Mal, M; Houghton, PJ. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14: 289-300.
70. Navarrete Gallegos, AA; Bravo, LA; Molina Montenegro, MA; Corcuera, LJ. 2012. Respuestas antioxidantes en dos ecotipos de *Colabantus quitensis* (Caryophyllaceae) expuestos a alta radiación UV-B y baja temperatura. *Revista Chilena de Historia Natural* 85: 419-433.
71. Nese, A. 2003. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry* 28(2): 54-61.
72. Obregón, L. 1998. “Maca” Planta medicinal y nutritiva del Perú. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, Perú.
73. OMS. 111° Reunión del Consejo Ejecutivo. Informe de Secretaria: Medicina Tradicional. Diciembre 2002.
74. Oré, R; Rodrigo, M; Valdivieso, R; Suárez, S; Oriondo, R. 2011a. Disminución del daño oxidativo y efecto hipoglicemiante de la maca (*Lepidium meyenii* Walp) en ratas con diabetes inducida por streptozotocina. *An Fac med.* 72(1):7-11.
75. Oré, R; Suárez, A; Rojas, L; Valdivieso, R; Oriondo, R; Tapia, F; Trabuco, J. 2011b. Efecto del extracto acuoso de maca sobre la función cognitiva en ratas recién destetadas. *Anales de la Facultad de Medicina* 72(1): 13-16.
76. Paxinos G , Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th Edn. Academic Press.U.S.A
77. Perry, E; Walker, M; Grace, J; Perry, R. 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *Trends in Neurosciences* 22(6): 273-280.
78. Pfeiffer RF. 2005. The phenotype spectrum of Parkinson disease. In: LeDoux M, ed. *Animal Models of Movement Disorders*. New York: Elsevier.

79. Pino-Figueroa A, Nguyen D, Maher TJ. 2010. Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca). *Ann N Y Acad Sci* 1199:77–85.
80. Pulgar, J. 1978b. La Maca y la región natural puna VI. Periódico “Expreso”, 20 de junio de 1978. Lima, Perú. p. 10.
81. Pulgar, J. 1978e. La Maca y el uso agrícola de la puna IX. Periódico “Expreso”, 15 de julio de 1978. Lima, Perú. p. 18.
82. Pulgar, J. 1978. La Maca y el uso de la región Puna VIII. Periódico “Expreso”, 4 de julio de 1978. Lima, Perú. p. 18.
83. Pulgar, J. 1978a. La Maca y el uso agrícola de la puna IV. Periódico “Expreso”, 29 de mayo de 1978. Lima, Perú. p. 12.
84. Pulgar, J. 1978c. La Maca y la región natural puna VII. Periódico “Expreso”, 26 de junio de 1978. Lima, Perú. p. 12.
85. Quirós C. y Aliaga, R. 1997. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). Andean roots and tubers: Ahipha, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. (M. Hermann and J. Heller, eds.). Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp. 173-197.
86. Retuerto, F., De los Santos, M., Barreto, T. y Lezama, M. 1996. Efectos citostáticos del extracto etanólico de *Lepidium meyenii* W. en células meristemáticas de *Allium cepa* L. En: Libro de resúmenes, V Reunión Científica, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” (ICBAR), 13-15 de marzo de 1996. Lima, Perú.
87. Riekkinen Jr P, Kejonen K, Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Riekkinen M. 1998. Hippocampal atrophy is related to impaired memory, but not frontal functions in nondemented Parkinson’s disease patients. *Neuro Report* 9:1507–1511.
88. Rocabado C, G; Gonzales D, E; Bermejo B, P; Abat M, MJ; Bedoya del Olma, L; Fuentes V, S. 2011. Asilamiento e identificación de un nuevo alcaloide de

Lepidium meyenii Walpers: Isolated and identification of a new alkaloid from species *Lepidium meyenii*

89. Rubio, J; Gonzales, GF; Qiong, W; Liu, X; Jiang, Z; Dang, H; Chen, Shi-Lin. 2011. Aqueous Extract of BlackMaca (*Lepidium meyenii*) on Memory Impairment Induced by Ovariectomy in Mice. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. V 2011. 7 p.
90. Sáez T, G. Concha C, M., Borrego O, S. sf. Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina, Hospital General Universitario de Valencia. 10, p. 283 – 302.
91. Sánchez Chávez, G; Salceda, R.2008. Enzimas Polifuncionales: el Case de la Acetilcolinesterasa. REB 27(2): 44-51.
92. Sandoval M, Okuhama NN, Angeles FM, Melchor W. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry 79: 207-213.
93. Sandoval, M. 1986. Virtudes fecundantes de la maca (Fertility virtues of maca). Revista Alimentaria No. 7 : 16-18.
94. Schoneich, C. 1999. Reactive species and biological aging: a mechanistic approach. Experimental Gerontology 34(1): 19-34.
95. Shing Gill, S; Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.
96. Silman, I; Sussman, JL. 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. Current Opinion in Pharmacology 5: 29-.302.
97. Singleton, V; Orthofer, R; Lamuela-Raventos, RM. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, Methods in Enzymology. 299(39): 152-175.
98. Solis, R. 1997. Valor Nutricional, morfología, clasificación de las especies de maca cultivadas en la zona altoandina de Pasco, su uso y formas de cultivo por

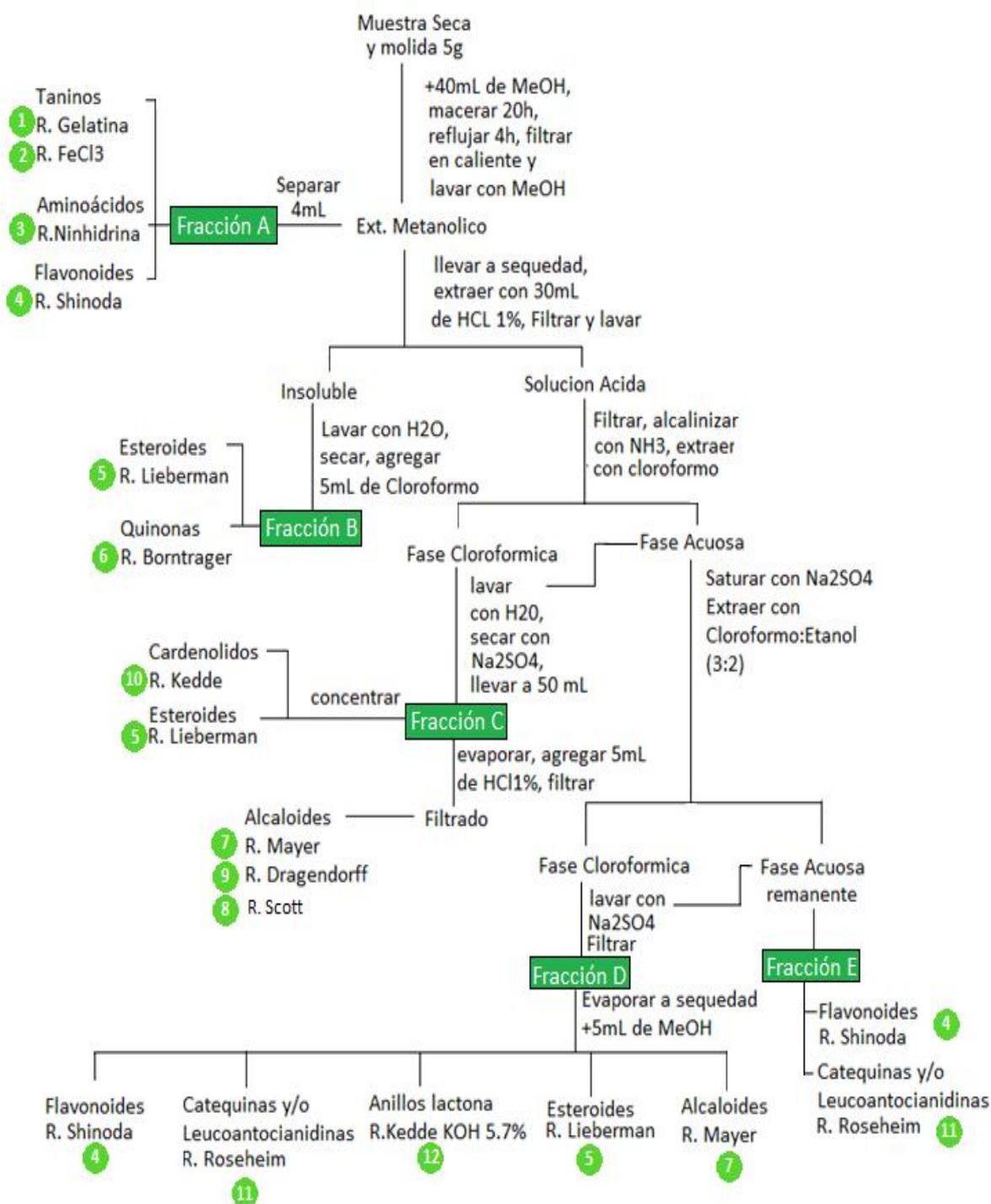
- la comunidad. Summary Book, IX International Congress of Andean crops. Cuzco, Perú. p. 63.
99. Soreq, H; Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase – new roles for and old actor. Nature reviews – Neuroscience 2: 294-302.
 100. Suárez, S; Oré, R; Arnao, R; Rojas, L; Trabucco, J. 2009. Extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física. Anales de la Facultad de Medicina 70(3): 181-185.
 101. Tapia, A., López, C., Marcelo, A., Canales, M. & Aguilar, J. 2000. La maca (*Lepidium meyenii*) y su efecto anti-estrés en un modelo animal en ratones. Acta andina (1999-2000) 8: 31-37.
 102. Tello, J., Hermann, M., Calderon, A. 1992. La maca (*Lepidium meyenii* WALP): cultivo alimenticio potencial para las zonas altoandinas. Boletín de Lima No. 81: 59-66.
 103. Thomsen, T; Kaden, B; Fischer, JP; Bickel, U; Barz, H; Gusztony, G; Cervos-Navarro, J; Kewitz, H. 1991. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity in Human Brain tissue and Erythrocytes by Galanthamine, Physostigmine and Tacrine. Eur. J. Chem. Biochem 29(8): 487-492
 104. Ungerstedt, U., Arbuthnott, G., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. Brain Res. 24, 485– 493
 105. Valdivia, M. Stimulation of sperm function by a natural product derived from the Peruvian herb *Lepidium meyenii* Walp “Maca”. Abstract presented at the International Conference of Reproductive Biology, Slovak Academy of Sciences, 1-3 September of 2000.
 106. Valerio I, Gonzales GF. 2005. Toxicological Aspect of the south American Herbs Cat’s Claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*) A critical synopsis. Toxicological Reviews 24: 11-35.
 107. Van Marum, RJ. 2008. Current and future therapy in Alzheimer's disease. Fundamental & Clinical Pharmacology. 22, p. 265-274.

108. Vargas L. 1989. La maca: Maravilloso afrodisiaco. Revista Globo 23-09-89. Lima, Perú. pag. 14-15.
109. Velásquez, M y col. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. Ciencia 75: 36-43.
110. Villena, A., Gonzales, FG., Córdova, A., Gonzales, C., Chung, A., Vega, K. 2001. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. Asian Journal of Andrology. 3 (4): 301 – 303.
111. Walpers. BIOFARBO. 19(1) 2011. 8 – 14.
112. Wattenberg, L.W. 1987. “Inhibitory effects of benzyl isothiocyanate administered shortly before diethylnitrosamine or benzo[a]pyrene on pulmonary and forestomach neoplasia A/J mice.” Carcinogenesis 8 (12):1971-1973. Summary only. Se.
113. Wattenberg, LW. 1981. Inhibition of carcinogenic-induced neoplasia by sodium cyanate, tert-butyl isocyanate, and benzyl isothiocyanate administered subsequent to carcinogen exposure. Cancer Research, August 1981, 41(2): 2991-2994. Summary only.
114. Yllescas, Ma.G. 1994. Estudio químico, fitoquímico comparativo de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp “maca” procedente de Carhuamayo (Junin). Trabajo de Aptitud profesional para optar el título de Químico Farmacéutico, Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
115. Zarrati Sacchetti, F; Forno Gisbert, R. 2003. La radiación ultravioleta en Bolivia. Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) Laboratorio de física de la atmósfera (IIF-UMSA). La Paz, Bolivia 2003.
116. Zheng, B., He, K., Hwang, Z., Lu, Y., Yan, S., Kim, C. y Zheng, Q. Effect of Aqueous Extract from *Lepidium meyenii* on Mouse Behavior in Forced Swimming Test. 2002. En: Quality Management of Nutraceuticals. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 258-268.

117. Zheng, B., He, K., Kim, C., Rogers, L., Shao, Y., Huang, Z., Lu, Y., Yan, S., Qien, L. y Zheng, Q. 2000. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 55 (4): 598-602.

VIII. ANEXOS

8.1. ESQUEMA DE MARCHA FITOQUIMICA



8.2. REGISTRO FOTOGRÁFICO

Preparación de las muestras



Muestra secas de muña y quinua



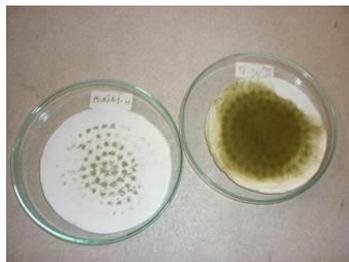
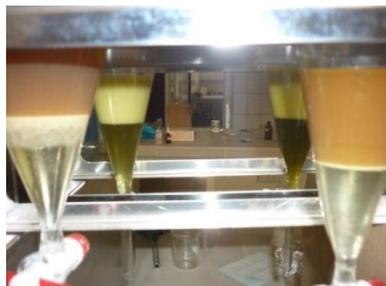
Pulverizado de las muestras



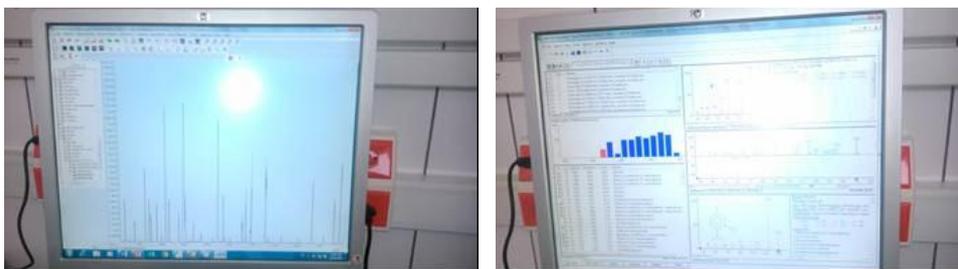
Pulverizado de las muestras Tamizado del pulverizado



Preparación de extractos



EQUIPO DE INVESTIGACION FITOQUÍMICA



8.3. METODOLOGÍA ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Detección de Aminoácidos

- Reactivo Ninhidrina: Pesar 0.1g de Ninhidrina para 100mL de etanol. Disolver.

Determinación de Aminoácidos: Utilizar el reactivo de ninhidrina para detectar aminoácidos en la muestra. Agregar 2 gotas de reactivo de ninhidrina al 1% y llevar a baño maría por unos minutos. Comparar con el tubo control. Reacción positiva, viraje a azul-violeta

Detección de Flavonoides

- Reactivo de Shinoda: Se le adiciona a la muestra limadura de Mg y HCl concentrado.

Determinación de Flavonoides Se utiliza el reactivo de Shinoda para lo cual se agrega una cinta de magnesio puro metálico al tubo con la muestra. Seguidamente, añadir 5 gotas del reactivo de Shinoda y 5 gotas de HCl puro. Reacción positiva, viraje a naranja con formación de espuma

Detección de Taninos

- Gelatina: Pesar 1g de gelatina para 100mL de H₂O destilada. Disolver en una planchita hasta que hierva. Batir constantemente.

Reactivo de Gelatina: Añadir 5 gotas de reactivo de gelatina a la muestra sin calentar, pues la gelatina puede desnaturalizarse. Seguidamente añadir 5 gotas de NaCl al 5% para hacer más visible la reacción y se dejar reposar unos minutos. Reacción positiva, precipitado blanquecino o turbidez.

- Reactivo de FeCl₃: Pesar 1g de cloruro férrico en 100mL de H₂O destilada. Disolver rápidamente. Por último, pasar al gotero.

Reactivo de Cloruro férrico: Añadir 2 gotas del reactivo a un tubo muestra y compararlo con el control, observar la reacción rápida (2 segundos). Reacción positiva, viraje a verde oscuro que no cambia al añadirse más gotas de reactivo.

Detección de Quinonas

- Reactivo de Börntrager: Se pesa 5g de hidróxido de sodio al 5% y se disuelve en 100mL de H₂O destilada.

Determinación de Quinonas: Agregar 5 gotas del reactivo de Börntrager, preparado a partir de 5g de Hidróxido de sodio disueltos en 100ml de agua destilada (5%). La reacción debe visualizarse en la interface. Reacción positiva: formación de anillo de color rojo.

Detección de Triterpenos y Esteroides

- Reactivo de Libermann-Burchard: Se necesitan 25mL de anhídrido acético más 0.5mL de ácido sulfúrico puro. Se mezclan ambos y se mantiene refrigerado en un gotero ámbar.

Determinación de Esteroides: Agregar 5 gotas del reactivo de Libermann-Burchard más unas gotas de ácido acético por las paredes del tubo. Llevar a baño maría para visualizar mejor la reacción. Reacción positiva, presencia de anillo color verde.

Determinación de Esteroides: Agregar 5 gotas del reactivo de Libermann-Burchard por las paredes más 10 gotas de ácido acético. Reacción positiva, formación de anillo de color verde. Secar por evaporación la fracción 2 y añadir 2ml de HCl al 1%. Filtrar y determinar alcaloides

Detección de Cardenólidos

- Reactivo de Kedde: Pesar 2g de 3.5-dinitrobenzoico. Enrazar a 100mL con metanol.

Determinación de Cardenólidos: Agregar 5 gotas de reactivo de Kedde por las paredes y adicionar unas gotas de KOH 5.7%. Reacción positiva, formación de un anillo rosado en la interface y de la fase superior de un tono rosado claro.

Detección de Alcaloides

- Reacción de Dragendorff:

Primer reactivo: Pesar 0.5312g de nitrato básico de bismuto y 6.25g ácido tartánico. Disolver ambos en 25mL de H₂O destilada.

Segundo reactivo: Pesar 10g de yoduro de potasio y disolverlo en 25mL de H₂O destilada. Mezclar los dos reactivos para llegar a 50mL.

Agregar HCl 1% al matraz que contiene los sólidos de la fracción D. mover con ayuda de una bagueta y con un capilar, recoger esta solución en el interior. Concentrar gota a gota de esta solución en un papel filtro o de capa fina. Colocar el papel con la solución concentrada en un soporte de un cartón. Rociar con el reactivo de Dragendorff. Reacción positiva, formación de un anillo marrón alrededor de la concentración de la muestra.

- Reactivo de Mayer:

Pesar 2g de dicloruro de mercurio y disolverlo en 50mL de H₂O destilada. Luego pesar 5g de yoduro de potasio y disolverlo en 50mL de H₂O destilada. Finalmente mezclar ambos.

Reacción de Mayer: Separar en un tubo un poco de la solución concentrada y agregar unas gotas del reactivo de Mayer. Reacción positiva, formación de una turbidez lechosa.

- Reactivo de Scott (tiocinato de cobalto):

Pesar 8g de cobalto y agregar 1ml de ácido orto fosfórico o 100ml de MeOH:H₂O

Reacción de Scott: Con un capilar, adsorber la solución acida en el interior y concentrar gota a gota en un papel filtro o de capa fina. Colocar el papel con la solución concentrada en un soporte de un cartón y rociar con el reactivo de Scott. Reacción positiva, formación halo de color turquesa-celeste.

Detección de Leucoantocianidinas

- Reactivo de Rosenheim: Se le agrega a la muestra gotas de HCl 2N/1- propanol.
Hervir 15-30 min.

Determinación de Leucoantocianidinas: Mediante la reacción de Rosenheim. Agregar 5 gotas de HCl 2N y colocar en baño maría durante media hora. Reacción positiva, coloración verde intenso.

8.4. METODOLOGÍA PARA EL ANALISIS DE CAPACIDAD ANTIXODIANTE (METODO ABTS)

Capacidad antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TROLOX eq./g}$): Método adaptado del reportado por Arnao, Cano & Acosta (2001). El método permite evaluar la capacidad antioxidante debido a la decoloración de un radical libre preformado por acción del compuesto antioxidante; es aplicable para antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

Reactivos

- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 97% sigma-aldrich
- ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (Sigma Aldrich)
- Metanol 99.8% (Sigma Aldrich)
- Persulfato de potasio
- Diclorometano
- Agua destilada

Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Balanza analítica
- Micropipetas de: 10 a 100 y de 100 a 1000 μl
- Tubos de centrífuga
- Agitador
- vortex
- Licuadora
- Cronómetro digital
- Fiola de 100 ml
- Probetas de 25, 50, 100 ml
- Vasos de precipitación de 50, 100, 150 ml
- Baguetas
- Bombillas de succión

- Piscetas
- Gradilla
- papel filtro Whatman N° 4

SOLUCIÓN ABTS

Reactivos A: Pesar 78.4 mg de ABTS y enrazar a 10 ml (fiola) con agua destilada, guardar en oscuridad a temperatura ambiente en frasco ámbar.

Reactivo B: Pesar 13.2 mg de persulfato de potasio y enrazar a 10 ml (fiola) con agua destilada, guardar en oscuridad a temperatura ambiente en frasco ámbar.

Los reactivos A y B protegidos de la luz y a temperaturas de refrigeración se pueden almacenar por 5 días.

Solución madre de ABTS: Se preparó la solución madre del radical cromógeno (ABTS²⁺), empleando volúmenes iguales (1:1) de los reactivos A y B, la mezcla se dejó reaccionar por 12h, en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. La mezcla es estable por 4h (luego de este periodo de tiempo la absorbancia se incrementa).

Dilución de la solución madre: Tomar una alícuota de 1 ml de la solución madre de ABTS y diluir con 60-65 ml de metanol (80%). Verificar la absorbancia en 1.1 ± 0.02 a una λ de 734 nm, de lo contrario se deberá corregir agregando metanol (80%) o solución madre, según sea el caso, volviendo a realizar la lectura a 734 nm hasta que la absorbancia esté dentro del rango, la solución diluida debe conservarse en frasco ámbar.

- Curva estándar hidrofílica
- 1. Pesar 0.02503g del antioxidante Trolox y aforar a 100 ml con metanol (80%) = A

Dónde:

$$\begin{array}{l} 250.3 \text{ g} \quad 1 \text{ mol} \\ 0.02503 \text{ g} \quad X = 0.0001 \text{ mol} \end{array}$$

$$X = \frac{0.0001 \text{ mol}}{100 \text{ ml}} * \frac{10^3 \text{ ml}}{L} * \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} = 1000 \frac{\mu\text{mol}}{L}$$

Diluciones de Trolox para la curva estándar de capacidad antioxidante

| | | | | | | |
|---------|---------|----|----|----|----|----|
| | Testigo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Trolox* | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |

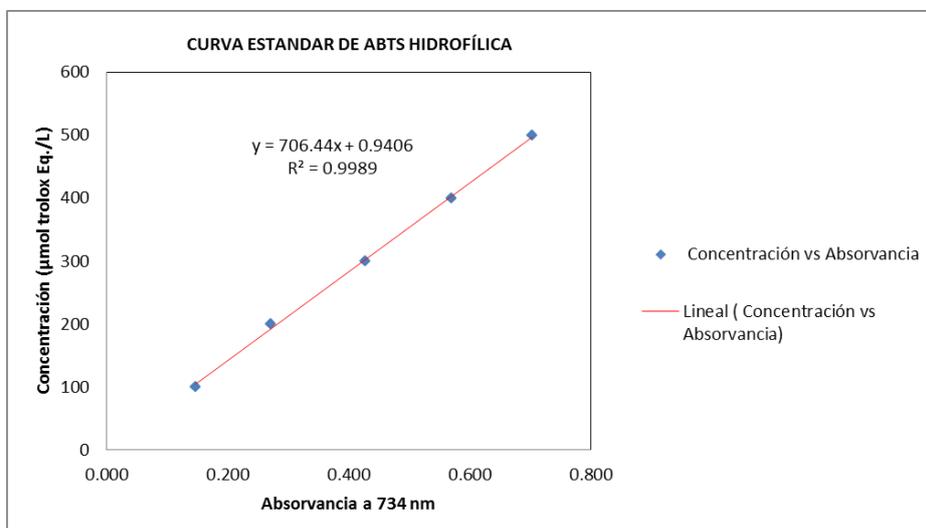
| | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|
| Metanol 80%* | 150 | 135 | 120 | 105 | 90 | 75 |
| ABTS | 2850 | 2850 | 2850 | 2850 | 2850 | 2850 |
| Volumen total* | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

(*) μl = microlitros

2. Muestra 1, tomar una alícuota de 15 μl de la solución A
3. Adicionar 135 μl de metanol
4. Adicionar 2850 μl de la dilución de la solución madre de ABTS
5. Al mismo tiempo se corrió el testigo con 150 μl de metanol y 2850 μl de la dilución de la solución madre de ABTS
6. Tiempo de reacción 30 minutos, a temperatura ambiente
7. Poner a cero el espectro con metanol (80%)
8. Realizar las lecturas de absorbancia a 734 nm

Nota: en caso de que la absorbancia sea mayor a 0.7, realizar diluciones hasta lograr que la absorbancia sea menor a 0.7 y mayor a 0.3

Figura 1: Curva estándar para capacidad antioxidante hidrofílica



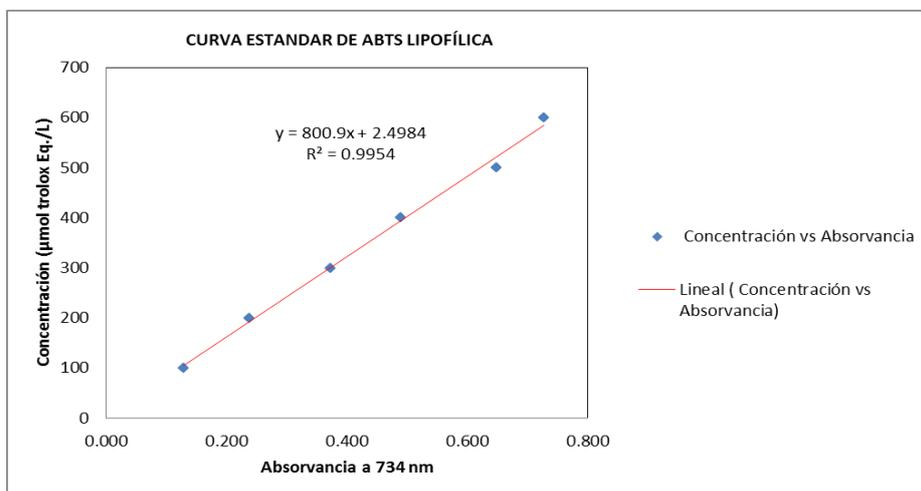
Dónde: $Y = \mu\text{mol Trolox Equivalente}$

$X = \text{Absorbancia (Testigo - Absorbancia de la muestra) a una } \lambda = 734\text{nm}$

- Curva estándar lipofílica

Se sigue el mismo procedimiento descrito para capacidad antioxidante hidrofílica cambiando el solvente por Diclorometano

Figura 2: Curva estándar para capacidad antioxidante lipofílico



La cuantificación de la capacidad antioxidante hidrofílica se expresa en µmol Trolox/100g de muestra, calculando con la siguiente ecuación:

$$\text{Trolox Eq.} = (706.44 \cdot \Delta Abs + 0.9406) \cdot (V/W) \cdot (0.25) \cdot Fd$$

La cuantificación de la capacidad antioxidante lipofílica se expresa en µmol Trolox/100g de muestra, calculando con la siguiente ecuación:

$$\text{Trolox Eq.} = (800.9 \cdot \Delta Abs + 2.4984) \cdot (V/W) \cdot (0.25) \cdot Fd$$

Dónde:

Y = µmol Trolox/100g de muestra

ΔAbs = Absorbancia del testigo – absorbancia de la muestra a 734nm

V = Volumen inicial a la que se afora

W = peso de la muestra

Fd = Factor de dilución

8.5. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Preparación de la curva estándar para fenoles totales

La curva de calibración es preparada a partir de una solución madre con ácido gálico, se pesó 0,5 gr de ácido gálico en 100 ml de metanol al 80% y se realizó de la siguiente manera:

Curva estándar

- A partir de la dilución de 0,020 g de ácido gálico por 100 ml se realizó la curva estándar como se indica en el cuadro a continuación.

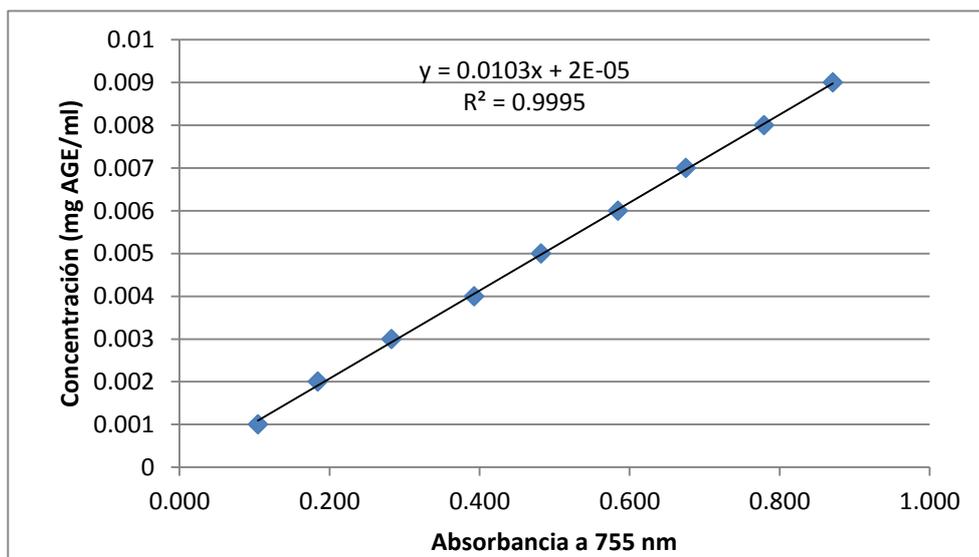
| | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ácido gálico* | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 |
| Metanol 80%* | 500 | 450 | 400 | 350 | 300 | 250 | 200 | 150 | 100 | 50 |
| Agua * | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 | 8250 |
| Folin * | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| Carbonato de sodio* | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Volumen total * | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |

(*) μl = micro litros

20 mg -----100ml

X 0.050ml \implies X = 0.01 mg

Ahora 0.01 mg diluida en 10 ml (0.01 mg/10 ml).



Curva estándar de ácido gálico

Dónde:

Y= mg de ácido gálico/ ml de muestra

X= Absorbancia de la muestra (755nm)

Análisis

Se prepararon soluciones de carbonato de sodio (1N) y Folin Ciocalteu (1N).

Para realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos, para cada muestra se tomaron alícuotas de 500µl, se adicionó 250 µl del reactivo de Folin Ciocalteu (1N), 8.25 ml de agua destilada y 1000 µl de carbonato de sodio (1N), los tubos fueron agitados en un vortex, se mantuvo en incubación por 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. Al mismo tiempo se realiza la preparación de un blanco con metanol 80% en lugar de la muestra y se trabajó bajo las mismas condiciones que las muestras, las lecturas se realizó a una λ de 755 nm.

El contenido de compuestos fenólicos se calculó utilizando la ecuación de la curva estándar de ácido gálico: $Y = 0.0103 X + 0.00$, los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/100g de muestra.

El contenido de compuestos fenólicos se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = \left(0.0103 * \left(A_{755 \text{ nm}} \right) + 0.000 \right)$$

Dónde:

W= peso de muestra (g)

V= volumen de extracto (ml)

Fd= factor de dilución

Y= mg de ácido gálico eq./ml de muestra

100 = término para expresar el contenido por 100 g de muestra

8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de regresión: Células Viables vs. Tiempo de pre-tratamiento (h), Dosis de extracto (ug)

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Regresión | 2 | 1882.84 | 941.42 | 85.48 | 0.000 |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | 1 | 177.50 | 177.50 | 16.12 | 0.001 |
| Dosis de extracto (ug) | 1 | 1705.34 | 1705.34 | 154.84 | 0.000 |
| Error | 21 | 231.29 | 11.01 | | |
| Falta de ajuste | 5 | 190.17 | 38.03 | 14.80 | 0.000 |
| Error puro | 16 | 41.11 | 2.57 | | |
| Total | 23 | 2114.13 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad | R-cuad (ajustado) | R-cuad (pred) |
|---------|--------|-------------------|---------------|
| 3.31867 | 89.06% | 88.02% | 84.93% |

Coefficientes

| Término | Coef | EE del coef. | Valor T | Valor p | FIV |
|-------------------------------|--------|--------------|---------|---------|-------|
| Constante | 51.210 | 2.270 | 22.510 | 0.000 | |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | 0.907 | 0.226 | 4.010 | 0.001 | 1.000 |
| Dosis de extracto (ug) | 2.238 | 0.180 | 12.440 | 0.000 | 1.000 |

Ecuación de regresión

Células Viables (%) = 51.21 + 0.907 Tiempo de pre-tratamiento (h) + 2.238 Dosis de extracto (ug)

Análisis de regresión: LDH% vs. Tiempo de pre-tratamiento (h), Dosis de extracto (ug)

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Regresión | 2 | 2592.63 | 1296.31 | 59.54 | 0.000 |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | 1 | 104.17 | 104.17 | 4.78 | 0.040 |
| Dosis de extracto (ug) | 1 | 2488.46 | 2488.46 | 114.30 | 0.000 |
| Error | 21 | 457.21 | 21.77 | | |
| Falta de ajuste | 5 | 416.54 | 83.31 | 32.78 | 0.000 |
| Error puro | 16 | 40.67 | 2.54 | | |
| Total | 23 | 3049.83 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad | R-cuad (ajustado) | R-cuad (pred) |
|---------|--------|-------------------|---------------|
| 4.66603 | 85.01% | 83.58% | 80.48% |

Coefficientes

| Término | Coef | EE del coef. | Valor T | Valor p | FIV |
|-------------------------------|--------|--------------|---------|---------|-------|
| Constante | 56.160 | 3.200 | 17.560 | 0.000 | |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | -0.694 | 0.317 | -2.190 | 0.040 | 1.000 |
| Dosis de extracto (ug) | -2.703 | 0.253 | -10.690 | 0.000 | 1.000 |

Ecuación de regresión

$$\text{LDH\%} = 56.16 - 0.694 \text{ Tiempo de pre-tratamiento (h)} - 2.703 \text{ Dosis de extracto (ug)}$$

Análisis de regresión: SOD (U/ml) vs. Tiempo de pre-tratamiento (h), Dosis de extracto (ug)

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Regresión | 2 | 29.9754 | 14.9877 | 384.78 | 0.000 |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | 1 | 0.1350 | 0.1350 | 3.47 | 0.077 |
| Dosis de extracto (ug) | 1 | 29.8404 | 29.8404 | 766.09 | 0.000 |
| Error | 21 | 0.8180 | 0.0390 | | |
| Falta de ajuste | 5 | 0.4780 | 0.0956 | 4.50 | 0.009 |
| Error puro | 16 | 0.3400 | 0.0212 | | |
| Total | 23 | 30.7933 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad | R-cuad (ajustado) | R-cuad (pred) |
|----------|--------|-------------------|---------------|
| 0.197361 | 97.34% | 97.09% | 96.55% |

Coefficientes

| Término | Coef | EE del coef. | Valor T | Valor p | FIV |
|-------------------------------|--------|--------------|---------|---------|-------|
| Constante | 0.6000 | 0.1350 | 4.440 | 0.000 | |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | 0.0250 | 0.0134 | 1.860 | 0.077 | 1.000 |
| Dosis de extracto (ug) | 0.2960 | 0.0107 | 27.680 | 0.000 | 1.000 |

Ecuación de regresión

$$\text{SOD (U/ml)} = 0.600 + 0.0250 \text{ Tiempo de pre-tratamiento (h)} + 0.2960 \text{ Dosis de extracto (ug)}$$

Análisis de regresión: ON (ug/ml) vs. Tiempo de pre-tratamiento (h), Dosis de extracto (ug)

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Regresión | 2 | 10.0302 | 5.01510 | 39.06 | 0.000 |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | 1 | 1.170 | 1.17042 | 9.120 | 0.007 |
| Dosis de extracto (ug) | 1 | 8.8598 | 8.85978 | 69.01 | 0.000 |
| Error | 21 | 2.6961 | 0.12838 | | |
| Falta de ajuste | 5 | 2.4427 | 0.48854 | 30.86 | 0.009 |
| Error puro | 16 | 0.2533 | 0.01583 | | |
| Total | 23 | 12.7262 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad | R-cuad (ajustado) | R-cuad (pred) |
|----------|--------|-------------------|---------------|
| 0.358306 | 78.82% | 76.80% | 72.37% |

Coefficientes

| Término | Coef | EE del coef. | Valor T | Valor p | FIV |
|-------------------------------|---------|--------------|---------|---------|-------|
| Constante | 3.7360 | 0.2460 | 15.210 | 0.000 | |
| Tiempo de pre-tratamiento 8h) | -0.0736 | 0.0244 | -3.020 | 0.007 | 1.000 |
| Dosis de extracto (ug) | -0.1613 | 0.0194 | -8.310 | 0.000 | 1.000 |

Ecuación de regresión

$$\text{ON (ug/ml)} = 3.736 - 0.0736 \text{ Tiempo de pre-tratamiento (h)} - 0.1613 \text{ Dosis de extracto (ug)}$$