



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Compuestos bioactivos y actividad antioxidante del
maíz morado *Zea Mays L.* procedente de tres regiones
del Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Ana Maria CCACCYA CCACCYA

ASESOR

Dra. María Mercedes SOBERÓN LOZANO

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ccaccya A. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante del maíz morado *Zea Mays L.* procedente de tres regiones del Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2020.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	-
DNI o pasaporte del autor	43492369
Código ORCID del asesor	0000-0001-5063-1407
DNI o pasaporte del asesor	07003675
Grupo de investigación	ANURMENT (Alimentos nativos, recursos naturales y metabolismo oxidativo)
Agencia financiadora	-
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM.
Año o rango de años que la investigación abarcó	2017-2020
Disciplinas OCDE	Bioquímica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América



Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado
Sección Maestría

ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 22 días del mes de octubre del año dos mil veinte siendo las 11:00 am, bajo la presidencia de la Dra. Silvia Suárez Cunza con la asistencia de los Profesores: Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas (Miembro), Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez (Miembro), y la Dra. María Mercedes Soberón Lozano (Asesora); la postulante al Grado de Magister en Bioquímica, Bachiller en Química, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **“COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL MAÍZ MORADO Zea Mays L. PROCEDENTE DE TRES REGIONES DEL PERÚ”** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B Muy bueno 18**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** a la postulante **ANA MARÍA CCACCYA CCACCYA**. Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo la 12:10 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.

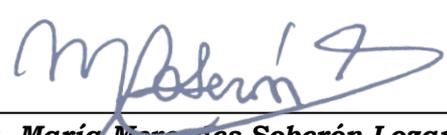


Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas
Profesor Principal
Miembro



Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez
Profesor Asociado
Miembro





Dra. María Mercedes Soberón Lozano
Profesora Principal
Asesora



Dra. Silvia Suárez Cunza
Profesora Principal
Presidente

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Dra. Mercedes Soberon por su aceptación, orientación y disponibilidad, también por facilitarme los materiales y reactivos necesarios para la realización de la tesis.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi profesora de la maestría, Dra. Inés Arnao por su apoyo constante y paciencia, por su empuje en cada momento que me llevaron a culminar la tesis.

A mi compañero de la maestría Blgo. Luis Salcedo por su apoyo constante, por haberme compartido sus conocimientos y permitirme así desarrollar la tesis.

A Hans, Lucy Guerra y Antonia Huamán por apoyarme a conseguir las muestras de maíz morado.

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición UNMSM por permitirme emplear los ambientes y equipos necesarios para llevar a cabo la tesis.

DEDICATORIA

A mis padres Oscar y Rufina.
Y a mis queridos hermanos Oscar, Martha y Flor
por todo su amor y apoyo constante.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	II
ÍNDICE.....	III
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ANEXOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	X
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación.....	2
1.4 Objetivos de la investigación	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes de la Investigación	5
2.2 Bases Teóricas	15
2.2.1 Maíz morado	15
2.2.2 Compuestos Bioactivos.....	16
2.2.3 Antioxidantes.....	25
2.2.4 Radicales libres.....	25
2.2.5 Especies reactivas del oxígeno (EROs).....	26
2.2.6 Estrés Oxidativo	26
2.2.7 Actividad antioxidante	26
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	30
3.1 Tipo y diseño de estudio.....	30
3.2 Materiales y Equipos	30
3.2.1 Materiales.....	30
3.2.2 Equipos	30

3.3	Material vegetal	30
3.4	Identificación taxonómica	32
3.5	Obtención de la coronta molida	32
3.6	Determinación de las condiciones óptimas para la obtención del extracto optimizado	33
3.7	Cuantificación de los compuestos bioactivos	34
3.7.1	Polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.	34
3.7.2	Flavonoides del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.	36
3.7.3	Antocianinas totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.....	37
3.7.4	Cianidina-3-glucósido del extracto acuoso e hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.....	38
3.8	Determinación de Capacidad Antioxidante	41
3.8.1	Captación de radical libre DPPH [•] del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.....	41
3.8.2	Captación del radical catiónico ABTS ^{•+} del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.	43
3.8.3	Índice de oxidación del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.	45
3.8.4	Inducción de la lipoperoxidación en tejido hepático y TBARS..	46
3.9	Análisis Estadístico	49
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		50
4.1	Resultados de la Investigación	50
4.1.1	Cuantificación de compuestos bioactivos.....	50
4.1.2	Determinación de capacidad antioxidante.....	55
4.2	Discusión	62
4.2.1	Compuestos bioactivos en el extracto de la coronta del maíz morado.	62
4.2.2	Capacidad antioxidante en el extracto de la coronta del maíz morado.	68
CAPITULO 5: CONCLUSIONES		73
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES		74
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA		75
ANEXOS		81

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Análisis proximal del grano y coronta del maíz morado</i>	<i>7</i>
<i>Cuadro 2. Clasificación Taxonómica del maíz morado.</i>	<i>15</i>
<i>Cuadro 3. Flujograma del proceso de la investigación.</i>	<i>32</i>
<i>Cuadro 4. Protocolo de determinación de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.</i>	<i>35</i>
<i>Cuadro 5. Protocolo de determinación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.</i>	<i>37</i>
<i>Cuadro 6. Gradiente de elución empleado para la cuantificación de cianidina-3-glucósido por HPLC.</i>	<i>40</i>
<i>Cuadro 7. Protocolo de determinación de la capacidad antioxidante por DPPH del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.</i>	<i>42</i>
<i>Cuadro 8. Protocolo de determinación de la capacidad antioxidante por ABTS^{•+} del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.</i>	<i>44</i>
<i>Cuadro 9. Protocolo de inducción de la lipoperoxidación en tejido</i>	<i>47</i>
<i>Cuadro 10. Protocolo de determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).</i>	<i>48</i>
<i>Cuadro 11. Polifenoles totales, flavonoides y antocianinas del extracto hidroalcohólico de la coronta de maíz morado de tres regiones del Perú.</i>	<i>50</i>
<i>Cuadro 12. Contenido de cianidina-3-glucósido por HPLC en coronta de maíz morado de tres regiones del Perú usando extracto hidroalcohólico y acuoso.</i>	<i>51</i>
<i>Cuadro 13. Capacidad antioxidante e IC 50 del extracto hidroalcohólico de coronta de maíz morado de tres regiones del Perú.</i>	<i>58</i>
<i>Cuadro 14. Índice de oxidación del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado de tres regiones del Perú.</i>	<i>59</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura básica de los Flavonoides</i>	17
<i>Figura 2. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides.</i>	18
<i>Figura 3. Estructura química de las antocianidinas más comunes en el grano de maíz (Zea mays L.).</i>	18
<i>Figura 4. Estructura de la antocianina a diferentes pHs.</i>	19
<i>Figura 5. Mecanismo de degradación de las antocianinas por efecto de la temperatura.....</i>	20
<i>Figura 6. Componentes del HPLC.</i>	23
<i>Figura 7. Biosíntesis de las antocianinas (ruta del ácido shikímico).</i>	24
<i>Figura 8. Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante.....</i>	27
<i>Figura 9. Formación del radical ABTS^{•+} y reacción con el antioxidante.</i>	28
<i>Figura 10. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico.</i>	29
<i>Figura 11. Cromatogramas obtenidos por HPLC del extracto hidroalcohólico de coronta de maíz morado. A) Estándar de cianidina-3-glucósido B) Perfil obtenido del extracto de Lima C) Perfil obtenido del extracto de Cajamarca D) Perfil obtenido del extracto de Apurímac.</i>	53
<i>Figura 12. Cromatogramas obtenidos por HPLC del extracto acuoso de coronta de maíz morado. E) Perfil obtenido del extracto de Lima F) Perfil obtenido del extracto de Cajamarca G) Perfil obtenido del extracto de Apurímac.</i>	54
<i>Figura 13. Porcentaje de inhibición por el método DPPH obtenido de las diferentes muestras (L) Lima (C) Cajamarca y (A) Apurímac.</i>	55
<i>Figura 14. Porcentaje de inhibición por el método ABTS obtenido de las diferentes muestras (L) Lima (C) Cajamarca y (A) Apurímac</i>	57
<i>Figura 15. Contenido de TBARS frente al extracto hidroalcohólico de coronta del maíz morado de tres regiones del Perú en un modelo de estrés oxidativo in vitro, en homogeneizado de hígado.</i>	60

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica del maíz morado de Lima.	81
Anexo 2. Flujograma de las operaciones necesarias para la obtención de la coronta molida.	82
Anexo 3. Contenido de antocianinas según factores de solvente y temperatura de extracción en coronta de maíz morado.....	83
Anexo 4. Contenido de antocianinas según factores de solvente y tiempo de extracción en coronta de maíz morado.....	83
Anexo 5. Curva de calibración del ácido gálico	84
Anexo 6. Curva de calibración de quercetina	84
Anexo 7. Curva de calibración del trolox para el ensayo de DPPH.	85
Anexo 8. Curva de calibración del ácido ascórbico para el ensayo DPPH ..	85
Anexo 9. Curva de calibración del trolox para el ensayo ABTS.....	86
Anexo 10. Curva de calibración del ácido ascórbico para el ensayo ABTS.	86
Anexo 11. Coeficiente de correlación de Pearson (r) del extracto hidroalcohólico de la coronta de maíz morado.....	87
Anexo 12. Fotos.....	88

RESUMEN

Introducción: Actualmente, hay un creciente interés por el consumo de alimentos funcionales ricos en compuestos bioactivos, y esto es debido a sus efectos benéficos en la salud del ser humano. **Objetivo:** Evaluar el contenido de los compuestos bioactivos y actividad antioxidante en coronta de maíz morado (*Zea mays L.*) de tres regiones del Perú. **Materiales y método:** Las muestras fueron obtenidas en Lima, Abancay y Cajamarca. Los extractos fueron preparadas con etanol al 20 %, pH 2, en una relación coronta: solvente 1:100 (p/v) a una temperatura de 70 °C por 30 minutos. **Resultados:** Las antocianinas totales estuvieron en el rango de 24,41 a 42,64 mg/g muestra seca, los polifenoles totales en 67,85 a 94,09 mg/g muestra seca expresado como equivalente de ácido gálico (EAG) y los flavonoides entre 3,09 a 4,43 mg/g muestra seca expresado como equivalente de quercetina (EQ). El contenido de cianidina-3-glucósido varió de 9,46 a 18,50 mg/g muestra seca y fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De estos ensayos la muestra de Lima presentó el mayor contenido de estos compuestos bioactivos. La capacidad antioxidante expresado como TEAC-DPPH estuvo en el rango de 79,46 a 118,29 µg/mg muestra seca, en el TEAC-ABTS fue de 80,43 a 124,33 µg/mg muestra seca, en el VCEAC-DPPH entre 87,67 a 130,50 µg/mg muestra seca y para el VCEAC-ABTS varió de 61,02 a 94,32 µg/mg muestra seca. Además, se observó que el extracto de coronta de maíz morado de las tres muestras fue capaz de reducir significativamente los niveles de TBARS en el rango de 31 a 53 % con respecto al control. Finalmente, el índice de oxidación abarcó entre 20 a 55 segundos. De estos ensayos la muestra de Lima obtuvo la mayor actividad antioxidante. **Conclusión:** La coronta de maíz morado de la región Lima presentó los valores más altos en polifenoles, flavonoides, antocianinas totales y cianidina-3-glucósido, además la mayor capacidad antioxidante.

Palabras clave: *Zea mays*, flavonoides, antocianinas, glucósidos, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

Introduction: Currently, there is a growing interest in the consumption of functional foods rich in bioactive compounds and this is due to its beneficial effects on human health. **Objective:** Evaluate the content of the bioactives compounds and antioxidant activity in purple corn cob (*Zea mays L.*) of three different regions of Peru. **Materials and method:** The samples were obtained in Lima, Cajamarca and Abancay. The extracts were prepared with ethanol to 20 %, pH 2, in a ratio of corn cob: solvent 1:100 (p/v) at a temperature of 70 °C for 30 minutes. **Results:** The results of total anthocyanins were between 24,41 to 42,64 mg/g dry sample, the total polyphenols were in the range 67,85 to 94,09 mg/g dry sample expressed as gallic acid equivalent (GAE) and the flavonoids between 3,09 to 4,43 mg/g dry sample expressed as quercetin equivalent (QE). The cyanidin-3-glucoside content varied in the range from 9,46 to 18,50 mg/g dry sample and was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Of these tests, the Lima sample obtained the highest content of the bioactives compounds. The antioxidant activity expressed as TEAC-DPPH was in the range of 79,46 to 118,29 µg/mg dry sample, in the TEAC-ABTS was of 80,43 to 124,33 µg/mg dry sample, in the VCEAC-DPPH between 87,67 to 130,50 µg/mg dry sample and for the VCEAC-ABTS varied of 61,02 to 94,32 µg/mg dry sample. Also, it was observed that purple corn extract of the three samples is capable of significantly reducing the TBARS levels in the range of 31 to 53 % with respect to control. Finally, the oxidation index included varied of 20 to 55 seconds. Of these tests the Lima sample obtained the highest antioxidant capacity. **Conclusion:** The purple corn cob of the region Lima presented the highest values in polyphenols, flavonoids, total anthocyanins, cyanidine-3-glycoside, also greater antioxidant capacity.

Key words: *Zea mays*, flavonoids, anthocyanins, glucosides, antioxidant activity.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

DMPD: N, N,- dimetil-p-fenilendiamina

Trolox: Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico.

INIA: Instituto Nacional de Innovación Agraria.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

MDA: Malondialdehído.

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico.

TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.

TCA: Ácido Tricloro acético.

IC 50: Concentración inhibitoria al 50%.

MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego.

INCAGRO: Instituto Nacional de Capacitación Agropecuaria.

RFC: Reactivo FolinCiocalteu.

EAG: Equivalente de ácido gálico.

ER: Equivalente en rutina.

EQ: Equivalente de quercetina.

PAL: Fenilalanina amonio liasa.

BPS: Buffer fosfato salino.

ANOVA: Análisis de Varianza.

EROS: Especies reactivas del oxígeno.

LP: Lipoperoxidación.

RL: Radical libre.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

SENAMHI: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

GRC: Gobierno Regional de Cajamarca.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

Existe una gran demanda de consumo de alimentos funcionales que además de aportar nutrientes ayudan en la prevención de diversas enfermedades degenerativas como cáncer, diabetes, obesidad, hipertensión arterial (Drago *et al.*, 2006). Estas enfermedades son en parte, originadas por varios factores tales como estilo de vida, dieta, estrés, exposición a la radiación, y algunos medicamentos. Todos estos factores de alguna u otra forma dan lugar a la generación de radicales libres debido a las reacciones bioquímicas de oxido-reducción que ocurren en el metabolismo celular (Lagouge *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2013). Por tal motivo, la búsqueda de alimentos conteniendo sustancias capaces de inhibir la degradación oxidativa, como son los antioxidantes, es una necesidad muy importante.

Los antioxidantes son responsables de estabilizar al radical libre mediante transferencia de electrones y átomos de hidrógeno, además poseen la capacidad de inhibir la degradación oxidativa como la lipoperoxidación. Dentro de este grupo de antioxidantes se encuentran las antocianinas, colorantes naturales que pertenecen al grupo de los flavonoides, responsables de dar el color morado, rojo y azul en diversos frutos, bayas y flores, y cuyo consumo ha ido en aumento y reemplazando a los colorantes artificiales por ser estos últimos tóxicos para la salud (Guillén *et al.*, 2014; Salinas *et al.*, 2012; Garzón, 2008 y Arroyo *et al.*, 2008).

Los reportes de las investigaciones realizadas para la determinación de antocianinas totales emplean usualmente el método de pH diferencial, pero recientemente se han introducido técnicas modernas como el HPLC, HPLC-MS, metodologías que permiten obtener una mejor identificación y separación de las diferentes antocianinas presentes en el maíz morado (Pedreschi y Cisneros, 2007; Yang *et al.*, 2010; Moreno, 2011).

En el Perú, una de las principales regiones donde se cultiva el maíz morado es Arequipa, cuya capacidad antioxidante ha sido estudiada por (Gorriti *et al.*, 2009 y Quispe *et al.*, 2011), pero en estos últimos años, debido a la demanda del maíz morado peruano por los mercados internacionales, su cultivo se ha extendido hacia otras regiones de país y en aquellas donde ya se cultivaban, se han introducido variedades mejoradas por INIA y la Universidad Agraria La Molina (MINAGRI, 2017). Por otro lado, el país cuenta con una compleja combinación de climas, suelos y microambientes que sustentan una variada diversidad biológica y de ecosistemas en sus regiones de Costa, Sierra y Selva. La variación del contenido de los metabolitos secundarios depende de factores intrínsecos como la genética de la planta y de factores extrínsecos que son las condiciones ambientales de cultivo (luz, temperatura, humedad y suelo). Sin embargo, hay escasos estudios publicados en revistas científicas o dispersos en documentos de circulación restringida como tesis e informe de proyectos, sobre los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del maíz morado cultivados en estas regiones, así como estudios comparativos entre las diferentes regiones de cultivo ya existentes.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es el contenido de los compuestos bioactivos y actividad antioxidante de la coronta del maíz morado *Zea mays L.* procedente de tres regiones del Perú?

1.3 Justificación

El maíz morado peruano posee un alto contenido de antocianinas, lo que lo coloca como un alimento antioxidante natural. Esta propiedad es conocida por diversos mercados internacionales y una prueba de ello es que en el 2017 la exportación de maíz morado llegó a 26 mercados internacionales, cinco países más que el anterior periodo 2016. El 10 % de esta exportación

es como colorante y el principal comprador de Perú es Estados Unidos (MINAGRI, 2017).

Dada la importancia de ello, es necesario profundizar el estudio sobre el contenido y tipo de las antocianinas, así como la propiedad antioxidante de este recurso vegetal, empleando métodos que nos permitan identificar y medir mejor estos compuestos, así como su capacidad antioxidante presente no solamente en el recurso en sí y sus productos, sino además, probada en muestras biológicas. Este conocimiento generado lo ubicaría en una mejor alternativa de alimentación saludable.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), proporciona una mayor información sobre la composición de las antocianinas; es una técnica de separación muy precisa que permite su cuantificación y facilita la obtención de sus perfiles cromatográficos. Debido a que el valor en el mercado del maíz morado se debe principalmente al alto contenido de antocianinas, el estudio de este metabolito por HPLC, serviría como un patrón de referencia de la buena calidad de este recurso vegetal, lo que garantizará la demanda en el mercado nacional e internacional.

Por otra parte, es importante realizar este estudio inicial de manera comparativa entre los producidos de diversas regiones para evaluar las diferencias o semejanzas en el contenido y actividad antioxidante de manera que se conozca de la calidad de este recurso vegetal con la finalidad de tener información que permita ingresar a mercados internacionales como una producción a nivel nacional.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el contenido de los compuestos bioactivos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* en coronta de maíz morado, *Zea mays L.*, procedente de tres regiones del Perú.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el contenido de polifenoles, flavonoides y antocianinas totales de la coronta de maíz morado procedente de tres regiones seleccionadas.
- Analizar el contenido de cianidina-3-glucósido en la coronta de maíz morado de las tres regiones seleccionadas
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de la coronta del maíz morado procedente de las tres regiones seleccionadas.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

El maíz morado es una variedad de *Zea mays L.* que posee la coronta y los granos de color morado, debido a la presencia de las antocianinas. Es una gramínea anual con un gran desarrollo vegetativo que puede alcanzar hasta los cinco metros de altura (Quispe *et al.*, 2011). Tiene su origen en países de Latinoamérica como Perú, Bolivia y México. En el Perú, las principales regiones productoras del maíz morado son Arequipa, Lima, Cajamarca, Huánuco, Ancash, Ica, La Libertad y Ayacucho. El 80% de la producción se ubica en Lima, Huánuco, Ancash y La Libertad (MINAGRI, 2017).

El maíz morado es un recurso vegetal oriundo de nuestro país y al que se le atribuye una interesante actividad biológica como antioxidante, por el tipo de compuestos bioactivos que contiene. Debido al incremento de la demanda de este recurso vegetal y sus derivados en el mercado nacional e internacional, en el país se han hecho esfuerzos por ampliar las zonas de cultivo e introducir variedades mejoradas del maíz morado que se puedan adaptar a estas nuevas zonas de cultivo y que mejoren la producción y comercialización de este recurso.

En las regiones de Apurímac y Cajamarca se han puesto en marcha proyectos de investigaciones con la finalidad de incrementar la producción de este recurso vegetal. Estas regiones presentan una variedad de pisos ecológicos y microclimas que son propios para el desarrollo de cultivos andinos como es el maíz morado.

En los últimos años los productores abanquinos han incentivado la producción de maíz morado de alta calidad con la finalidad de convertir a Apurímac en líder de la producción de maíz morado del Perú. Por ese motivo, INCAGRO cofinancia el subproyecto con el objetivo de extender la

superficie de cultivo e introducir al maíz morado como una producción competitiva para el departamento de Apurímac (Pozo, 2012).

En la región de Cajamarca se ha introducido el maíz morado denominada INIA 601, variedad adaptable a los suelos de Cajamarca. Esta variedad se siembra entre 2200 a 3000 msnm, altitudes que se pueden encontrar en el distrito de Eduardo Villanueva de la provincia de San Marcos-Cajamarca (GRC, 2019).

Se cultivan diversas variedades de maíz morado; todas ellas se originaron a partir de la variedad kulli que todavía se cultiva en nuestro país en altitudes mayores a los 3000 msnm, especialmente en Junín, Huancavelica, Apurímac, Cusco y Cajamarca. Esta es de mazorca corta, esfera-cónica, ahusada pronunciadamente hacia la punta; de ancho intermedio, número promedio de hileras, 12, irregularmente dispuestas; pedúnculo corto y delgado (Salhuana, 2004).

Flores (2008), describe otras variedades de maíz morado:

- **Morado Cusco:** Esta variedad posee granos grandes, dispuestos en mazorcas de 8 hileras muy bien definidas. Su cultivo se realiza en zonas de latitud intermedia, en los departamentos de Cusco y Apurímac.
- **Morado Arequipeño:** la forma de la mazorca es similar a la variedad Cusco, pero más chica. Los granos están dispuestos en hileras regulares. El color de la tusa (coronta) es de menor intensidad y más precoz que otras variedades.
- **Morado Canteño:** Es una variedad nativa, posee una altura entre 1,8 a 2,5 metros y su floración ocurre entre los 110-125 días. Su cultivo se presenta en diferentes lugares de la sierra del Perú especialmente en las zonas altas del valle de Chillón (Lima) hasta los 2500 msnm.
- **Morado de Caraz:** Se cultiva en la provincia de Caraz (Ancash) y puede adaptarse también en la costa ya que es de precocidad intermedia. El tamaño del grano es menor que las variedades de

origen Cuzqueño. Esta variedad muestra mayor rendimiento y presenta la tusa (coronta) más pigmentada.

- **Negro de Junín:** Presenta granos grandes y negros dispuestos irregularmente en una mazorca corta y redondeada. Se cultiva en la sierra centro y sur, llegando hasta Arequipa.
- **Variedades mejoradas:** El PMV-581 y PMV-582 son variedades mejoradas obtenidas por la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). El primero es empleado para la siembra en la sierra central y el segundo para toda la costa central. Dentro de las variedades mejoradas por el Instituto Nacional de Innovación Agraria tenemos: INIA 601 para la siembra en la sierra norte (Cajamarca) y el INIA 615 “Negro Canaán” para la sierra centro y sur (Ayacucho, Junín, Apurímac, Cusco) y en la costa sur (Arequipa).

En cuanto al análisis proximal de este recurso vegetal, en el grano del maíz morado se destaca el contenido de carbohidratos y proteínas. La coronta tiene una importante fracción de fibra. El detalle del análisis proximal del grano y coronta de maíz morado se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Análisis proximal del grano y coronta del maíz morado

Componente	Porcentaje (%)	
	Grano	Coronta
Humedad	11,4	11,20
Proteínas	6,7	3,74
Grasa	1,5	0,32
Fibra	1,8	24,01
Cenizas	1,7	3,31
Carbohidratos	76,9	57,42

Fuente. Datos tomados de Justiniano (2010).

En México, Salinas *et al.*, (2013) presentaron una revisión de aquellas investigaciones que tuvieron como objetivo la caracterización de antocianinas en granos de maíces mexicanas. Los autores demostraron que el contenido y el tipo de antocianinas en el grano de maíz varían en razón al color del grano y concentración del pigmento acumulado en el pericarpio y/o en la aleurona del grano. Los granos de color rojo magenta concentraron las antocianinas en el pericarpio y la capa de aleurona y presentaron hasta 10 veces más antocianinas que los de grano azul/morado, cuyas antocianinas se concentraron solamente en la capa de aleurona. La acumulación del pigmento en las estructuras del grano determina el posible uso de este tipo de maíces. Si el pigmento se concentra en la aleurona, el grano puede ser útil para la elaboración de productos con tonalidades azules, mientras que si se acumula en el pericarpio y en cantidad suficiente, el grano pigmentado podría considerarse para la extracción de pigmentos.

Las antocianinas del maíz tienen su origen en la cianidina. Hay antocianinas cuya estructura está conformada por la antocianidina y un azúcar unido comúnmente en el carbono 3 de su estructura, y son las de tipo no acilada. Es posible que al azúcar se una con uno o más radicales acilos proveniente de ácidos orgánicos (alifáticos o aromáticos); cuando esto ocurre se generan las antocianinas de tipo aciladas (Salinas *et al.*, 2013).

Pedreschi y Cisneros (2007) realizaron estudios sobre la composición de los polifenoles en una muestra de maíz morado procedente de los Andes Peruanos y proporcionado por la casa Fitofarma (Lima). Se obtuvo un extracto de las mazorcas utilizando como solvente una solución hidroalcohólica al 60 %; posteriormente fue convertido en polvo. Sus resultados mostraron la presencia de varios ácidos fenólicos como el ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido protocatéquico y derivados de quercetina y hesperidina. De todos ellos, los compuestos de quercetina y derivados fueron los más abundantes. En cuanto a las antocianinas, reportaron: cianidina-3- glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y

las formas aciladas de cada una de ellas. Cianidina-3-glucósido y su derivado se encontró en mayor cantidad.

Debido a que el maíz morado también tuvo su origen en el país de Bolivia, Cuevas *et al.*, (2008) realizaron investigaciones con los granos de seis variedades bolivianas: Ayzuma (color púrpura), Tuimuru (color púrpura), Huaca Songo (color rojo), Checchi (color púrpura), Oke (color púrpura) y Kulli (color negro). Para la separación, purificación e identificación de las antocianinas presentes en los granos de las variedades antes mencionadas, emplearon técnicas de cromatografía, HPLC-DAD y LC-MS/MS. Los autores identificaron dos antocianinas mayoritarias en todas las variedades de maíz morado estudiadas: cianidina-3-glucósido, y cianidina-3-(6"-malonil)-glucósido y atribuyeron que las antocianinas presentes en menor proporción son responsables de las tonalidades de color y pigmentación presente en las variedades de maíz morado.

La cianidina-3-glucósido ha servido para evaluar las variedades mejoradas del maíz morado desarrolladas por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y cultivadas en la región de Cajamarca. Así, Arriaga y Castro (2011), determinaron la concentración de cianidina-3-glucósido por HPLC, procedente de siete germoplasmas de maíz morado: sin fertilizar, fertilizado, sintético R, sintético amplio, línea 9, cruce 1 y cruce 2. Las determinaciones se hicieron tanto en los granos como en las corontas. Como solvente de extracción emplearon el agua a 70°C durante 1,5 horas. Concluyeron que la concentración de cianidina-3-glucósido fue mayor en coronta (409,61 a 3083,82 mg/100g) que en grano (29,21 a 147,57 mg/100g). Dentro de las muestras de grano fue la Línea 9 que presentó el máximo valor con 147,57 mg/100g, y en coronta, fue la muestra Sintético Amplio con 3083,82 mg/100g.

Por otra parte, Moreno (2011) desarrolló un trabajo de validación para una metodología analítica que permitiera cuantificar cianidina-3-glucósido por HPLC. Para ello, utilizó las muestras de maíz morado (sin fertilizar, fertilizado, sintético R y cruce) y condiciones de extracción, utilizadas por

Arriaga y Castro. Con la metodología validada, determinó la concentración de cianidina encontrando una mayor concentración en la coronta que en el grano. La variedad sintético R fue la que tuvo más cianidina-3-glucósido (1194,99 mg/100g) que las otras muestras estudiadas.

La actividad antioxidante de las antocianinas también ha sido estudiada. Kuskoski *et al.*, (2004) determinaron la actividad antioxidante de pigmentos antociánicos puros: delphinidina, cianidina, peonidina, pelargonidina y malvidina todos ellos glucosilados a excepción de la delphinidina. Utilizaron el método de radical ABTS^{•+} que se forma por la reacción de ABTS con persulfato potásico. Sus resultados mostraron que la delphinidina y cianidina-3-glucósido presentaron actividad antioxidante dos veces más que el Trolox, compuesto que es utilizado como antioxidante sintético de referencia. Las demás antocianinas tuvieron menor actividad, pero con un potencial equiparable al Trolox.

Ramos *et al.*, (2012) determinaron la actividad antioxidante de muestras de maíz morado de la variedad INIA-601, obtenida de la Estación Experimental Baños del Inca-Cajamarca, Perú. Se trabajaron en los granos y para su extracción emplearon soluciones metanólicas ácidas a diferentes concentraciones. Para determinar la actividad antioxidante en estos extractos, se empleó el método DPPH, ABTS, FRAP y el ensayo de desoxirribosa. Midió también "*in vitro*" la respuesta celular antioxidante en tejido animal aislado. Para ello, prepararon los extractos con una mezcla de metanol: agua (80:20) acidificado. Valores de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y peroxidasa total fueron reportadas como parte de esa respuesta celular.

Mex *et al.*, (2013) estudiaron los granos de cinco variedades de maíz: variedades criollas de colores blanco y amarillo o híbrido blanco, variedad roja y variedad morada, cultivadas en Hopelchén, México. Determinaron la actividad antioxidante empleando técnicas de DPPH, DMPD, índice de oxidación, reducción del ion férrico y del peróxido. Los extractos se obtuvieron con un solvente hidroalcohólico al 70%. La variedad morada y

roja presentaron una mayor actividad antioxidante con la técnica de DPPH junto con una mayor cantidad de compuestos fenólicos y antocianidinas. Sin embargo, en el ensayo de DMPD, la variedad roja tuvo una mejor capacidad reductora que la variedad morada. Los autores explican este comportamiento en el sentido de que el DPPH refleja mejor la actividad antioxidante de compuestos de menor polaridad, mientras que la técnica de DMPD, los compuestos antioxidantes más hidrofílicos debido a que contienen más grupos polares o residuos de azúcar.

El estudio realizado por Doroteo *et al.*, (2013) se basó en el análisis comparativo de la actividad antioxidante de seis plantas peruanas: *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto). Para ello, preparó extractos hidroalcohólicos, y determinó la capacidad antioxidante por los ensayos de DPPH, ABTS, poder reductor, por inhibición del radical anión superóxido y por el radical hidroxilo. Sus resultados mostraron que para la mayoría de los ensayos, la *Uncaria tomentosa* y la *Krameria triandra* mostraron mayor actividad antioxidante. Los extractos con mayor poder reductor fueron los de ratania, uña de gato y maíz morado. La alta actividad antioxidante mostrada en este ensayo parece deberse a su gran contenido de sustancias antioxidantes: ácido ascórbico, compuestos fenólicos totales y flavonoides.

Hay una razonable evidencia científica de que una adecuada ingesta de frutas, vegetales, granos, cereales tienen un efecto benéfico para la salud, y esto en razón a sus contenidos de compuestos bioactivos como los flavonoles, flavonas, flavononas, catequinas, antocianidinas, procianidinas B y sus derivados (Naczki *et al.*, 2006); (Kyle y Duthie, 2006).

Investigaciones a través de ensayos *in vitro* han demostrado que los flavonoides son potentes agentes anticancerígenos y antiaterogénicos. La explicación que se da para esta acción benéfica es la de actuar como antioxidantes para las moléculas de ADN, como protectores contra los

efectos nocivos de la lipoproteínas de baja densidad (LDL), contra la modulación de la inflamación, inhibición de agregación de plaquetas, efectos estrogénicos, etc. (Duthie *et al.*, 2000); (Kyle y Duthie., 2006).

Se estima que la hipertensión es la causa de por lo menos el 45 % de las muertes por cardiopatías en el planeta (OMS, 2013); sólo en el Perú, esta enfermedad es uno de los principales problemas de salud pública; los resultados de una Encuesta Demográfica y de Salud Familiar del año 2012 mostraron que un 29,7 % de la población adulto mayor declaró haber sido informada en algún momento por un médico o profesional de la salud que padece de hipertensión arterial; un 70,1 % seguían tratamiento antihipertensivo farmacológico y el 29,9 % ningún tratamiento (INEI, 2012).

Estudios experimentales han demostrado que el incremento en el consumo de antocianinas puede disminuir la presión sanguínea en personas hipertensas y elevar la capacidad antioxidante total de la sangre. Arroyo *et al.*, (2008) describieron el efecto hipotensor de un extracto hidroalcohólico de *Zea mays L.* (maíz morado) en ratas inducidas a hipertensión con N-G-nitro L-arginina-metil-éster (L-NAME). Los autores consiguieron reducir en un 20,1% los valores de PAM (presión arterial media), 20,7 % de PAS (presión arterial sistólica) y 15,7 % de PAD (presión arterial diastólica), con una dosis de 1000 mg/kg. Esta reducción de la presión arterial fue explicada por la actividad vasodilatadora, dependiente de óxido nítrico, de dicho extracto.

Xu *et al.*, (2004) demostraron que la cianidina-3-glucósido indujo la sobreexpresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial y un aumento de la liberación de óxido nítrico de manera dependiente del tiempo y dosis, mejorando así la disfunción endotelial y normalizando la presión arterial.

También se ha reportado el efecto hipocolesterolémico del maíz morado. Arroyo *et al.*, (2007) investigaron este efecto con un extracto hidroalcohólico de maíz morado en ratas hipercolesterolémicas. Para ello, utilizaron dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg de maíz morado durante un periodo de 60 días.

Además, determinaron la actividad antioxidante en el suero de los animales de experimentación después del período de ingestión de maíz morado, por el método de TBARS. Sus resultados mostraron que las dosis de 250 y 500 mg/Kg redujeron el nivel de colesterol total en un 21,5 y 11,2 % respectivamente. No hubo diferencia significativa con los niveles de triacilgliceroles y HDL-colesterol. Los cortes histológicos de la arteria aórtica de los animales que consumieron el maíz morado, mostraron una reducción de las placas de ateroma comparado con la muestra histológica de los animales hipercolesterolémicos, y en cuanto a la actividad antioxidante, hubo una notable disminución de los niveles de malondialdehído en 56,4 % en los animales que consumieron maíz morado en contraparte con los resultados de los animales hipercolesteolémicos.

Las investigaciones realizadas por Quiñones *et al.*, (2012) mostraron el efecto beneficioso de los polifenoles a nivel cardiovascular. Estas investigaciones mostraron efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos; además, los polifenoles también poseen efectos antilipémicos y antiaterogénicos. Algunos estudios han demostrado que estos compuestos también pueden inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), y la inhibición de esta enzima justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores.

Flores (2008), investigó el efecto del maíz morado frente a la respuesta inflamatoria y daño articular en ratas con artritis experimental. Se empleó el modelo de artritis inducida por la administración de 200 μ L de pristane en la base de la cola de las ratas. Se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante 21 días, mediante medición interdiaria del edema de la pata derecha y al concluir el experimento se realizó una valoración radiológica de la zona afectada tomando en cuenta las características osteoarticulares: desmineralización ósea, erosión ósea y de cartilago, periostitis y alineamiento de falanges. Los grupos tratados con 10 % de maíz morado y metotrexato, mostraron una respuesta inflamatoria significativamente menor a lo largo del experimento que los otros grupos de tratamiento. En cuanto al daño articular, los tratados con maíz morado y metotrexato mostraron efecto

protector; solamente los animales tratados con pristane y vehículo, desarrollaron daño articular.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Maíz morado

2.2.1.1 Coronta del maíz morado.

Denominada también carozo, olote o mazorca. Espiga en que se crían los frutos muy juntos y dispuestos alrededor de un eje. En la coronta se encuentran un mayor porcentaje de antocianinas que en la cáscara del grano del maíz morado (Fossen *et al.*, 2001).

2.2.1.2 Caracterización Taxonómica.

La descripción taxonómica del maíz morado es la siguiente:

Cuadro 2. Clasificación Taxonómica del maíz morado.

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Clase	Angiosperma
Orden	Gramideas
Familia	Gramideae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Mays</i>
Nombre científico	<i>Zea mays</i> L

Fuente. Datos tomados de Rafael (2017).

2.2.1.3 Exigencias agroecológicas del cultivo.

- *Clima.* Para su crecimiento activo, el maíz morado requiere temperaturas de 25 a 30°C y una elevada iluminación para desarrollar la fotosíntesis y producir su propio alimento. Para su

siembra la temperatura debe ser mayor de 10°C, siendo la más favorable 15° C (Justiniano, 2010).

- *Suelo*. El cultivo de maíz morado requiere suelos con estructura suave y franco, con mucha materia orgánica, con elevada capacidad de retención del agua, buen drenaje y aireación para el buen desarrollo de sus raíces. El pH adecuado para su cultivo es entre 6 - 6,5, fuera de estos límites suele aumentar o disminuir la disponibilidad de ciertos elementos y producir toxicidad o carencia (INIA, 2016).
- *Época de siembra*. Pinedo (2015) afirma: El maíz se puede sembrar durante todo el año, las épocas más adecuadas son de abril a agosto (siembra de invierno) y de noviembre a febrero (siembra de verano) y en la costa peruana la mejor época para la siembra del maíz morado es en el invierno en los meses de mayo a junio. En lugares por encima de los 2700 msnm es recomendable sembrar preferentemente a partir de la segunda quincena de octubre.

2.2.2 Compuestos Bioactivos

Los compuestos bioactivos también conocidos como nutraceuticos o fitoquímicos son componentes que tienen actividad biológica dentro del organismo y se encuentran principalmente en los alimentos como frutas y verduras. Se pueden clasificar en tres grupos: terpenoides (carotenoides y esteroides); compuestos fenólicos (flavonoides como las antocianinas) y compuestos azufrados (alíina, alicina y dialilsulfuro). (Martínez y Carbajal, 2012).

2.2.2.1 Flavonoides. Los flavonoides forman parte de los compuestos fenólicos, tienen una estructura química muy definida denominada como compuestos C6-C3-C6 (**Figura 1**). Estas sustancias se caracterizan por

poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos mediante una cadena de 3 carbonos que pueden formar o no un tercer anillo (Borja, 2013).

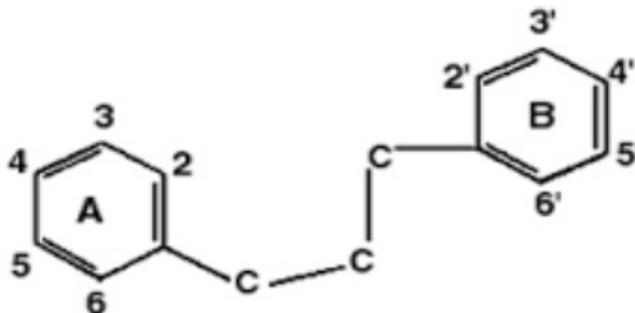


Figura 1. Estructura básica de los Flavonoides

Fuente. <http://flavonoides.blogspot.es/tags/estructura/>

La clasificación de los flavonoides depende de las variantes estructurales que presenta la cadena central C3. De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, etc. (**figura 2**)

2.2.2.2 Antocianinas. Las antocianinas son flavonoides, debido a que poseen el esqueleto característico de C6-C3-C6, además forman parte de la gran familia de los polifenoles. Su estructura básica es el grupo flavilio (2-fenilbenzopirilio). Estos pigmentos son los responsables de dar el color rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras, son compuestos polares, que le permite ser soluble en etanol y agua. Las antocianinas son glicósidos que tienen en la posición 3 un azúcar unido mediante el enlace β -glicosídico que cuando se rompe forma la aglicona, conocida como antocianidina, siendo las más comunes: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina y petunidina (Cuevas *et al*, 2008).

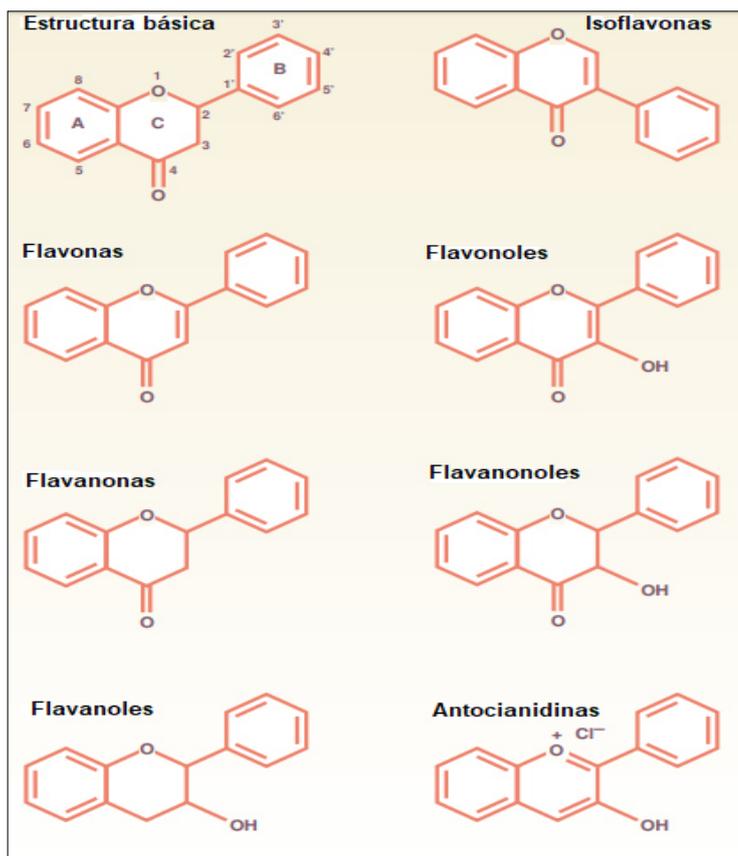


Figura 2. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides.

Fuente: Álvarez y Orallo (2003).

Los sustituyentes en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B de la estructura determinan el tipo de antocianidina o aglicona (**figura 3**).

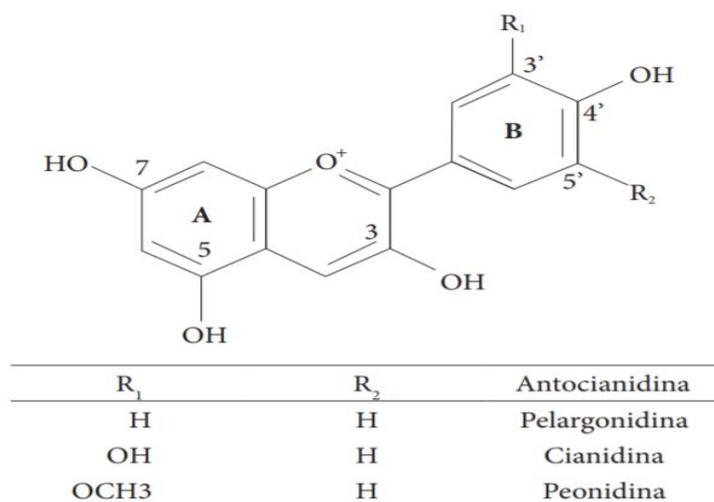


Figura 3. Estructura química de las antocianidinas más comunes en el grano de maíz (*Zea mays* L.).

Fuente: Salinas et al., (2013)

2.2.2.3 Factores que alteran la estabilidad de las antocianinas.

Efecto del pH. Las antocianinas son más estables en medio ácido donde predomina la forma de catión flavilio, el cual posee color rojo, al incrementar los valores de pH dicha estructura sufre el ataque nucleofílico del agua dando lugar a chalconas incoloras (Guzmán *et al.*, 2010).

Efecto de la temperatura. Es un factor crítico que influye en la degradación de las antocianinas que tiene como mecanismo: la hidrólisis del enlace glicosídico (posición 3), apertura del anillo y como último formación de chalconas incoloras (Guzmán *et al.*, 2010).

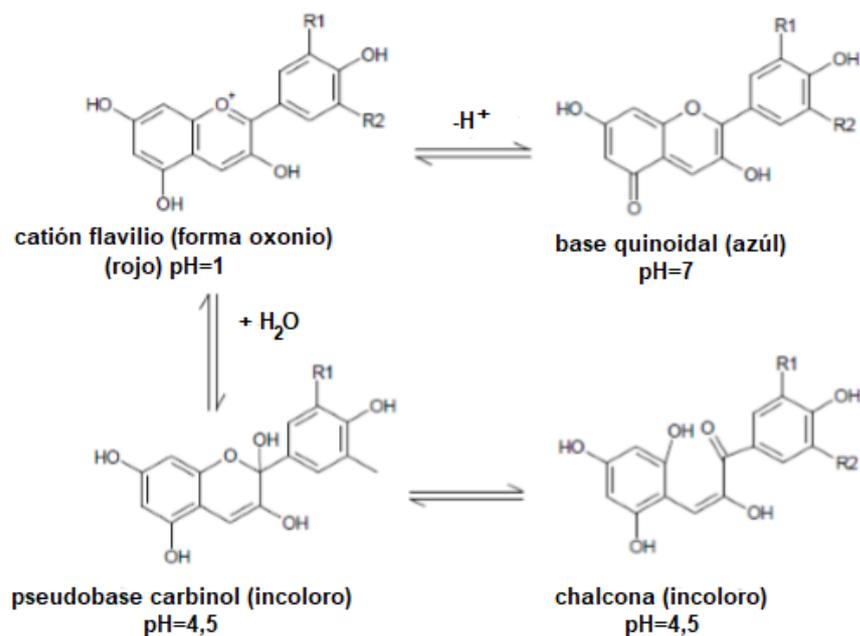


Figura 4. Estructura de la antocianina a diferentes pHs.

Fuente. Datos tomados de Santacruz (2011)

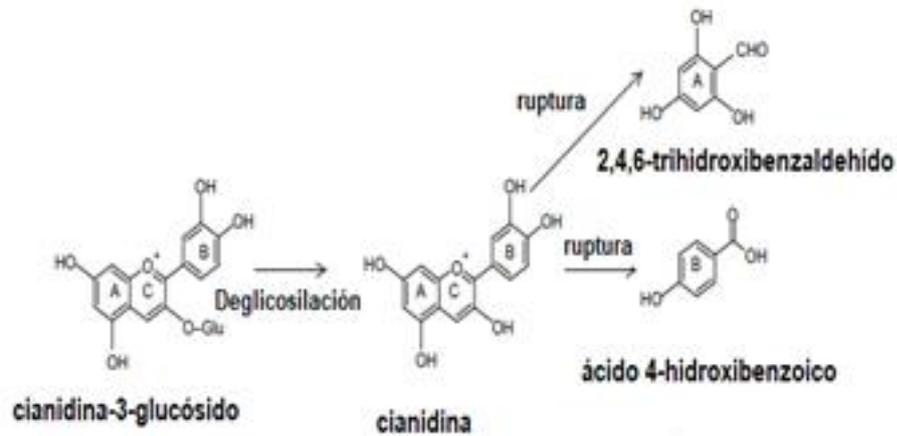


Figura 5. Mecanismo de degradación de las antocianinas por efecto de la temperatura.

Fuente. Datos tomados de Patras *et al.*, (2010).

Efecto del ácido ascórbico. El ácido ascórbico en presencia del oxígeno se oxida generando peróxido de hidrógeno, que es el responsable de la oxidación de las antocianinas (Guzmán *et al.*, 2010).

Efecto de la luz. Es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. En presencia de luz incrementa la producción de chalconas y en su ausencia predomina la estructura más estable, catión flavilio. (Guzmán *et al.*, 2010)

2.2.2.4 Métodos de extracción de las antocianinas.

Extracción Directa. Es aquella en que el soluto se pone en contacto directo con el solvente. Debido a las características polares de las antocianinas, el solvente utilizado es agua o alcohol (metanol o etanol).

Generalmente, se usa el etanol como solvente de extracción para fines alimenticios. Tenemos como ejemplo:

Maceración: Es un tipo de extracción sólido-líquido donde la materia prima queda sumergido con el solvente por varias horas a temperatura ambiente. De esta manera se evita la degradación del pigmento, pero el rendimiento es bajo (Elias y Gamero, 1988).

Infusión: Es el mismo procedimiento de la maceración, pero en este caso se emplea calor para acelerar la extracción de las antocianinas, se recomienda emplear temperaturas menores a 100 °C con el fin de evitar su degradación (Elias y Gamero, 1988).

Extracción Soxhlet. Para este tipo de extracción se emplea un equipo llamado Soxhlet, donde el disolvente se calienta hasta ebullición y son los vapores que entran en contacto directo con la materia prima. El solvente a usar debe tener bajo punto de ebullición como el etanol, debido a que si usara el agua, emplearía 100 °C y provocaría la degradación de las antocianinas (Elías y Gamero, 1988).

2.2.2.5 Métodos de cuantificación de las antocianinas.

Cuantificación de antocianinas por espectrofotometría. Para conocer el contenido de antocianinas totales se utiliza el método de pH diferencial que se fundamenta en la particularidad que poseen las antocianinas que es el de adoptar diferentes coloraciones y estructuras a determinados pH, donde la forma oxonio predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4,5 (Giusti y Wrolstad, 2001).

Cuantificación y caracterización de antocianinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Es una técnica analítica de separación ampliamente utilizada en la actualidad en el área de bioquímica y química analítica. En ésta metodología la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria un sólido o líquido. Cada componente de una

muestra avanzará a lo largo de la columna con una velocidad diferente que dependerá de su polaridad por cada una de las fases, creando así su separación (García, 2016).

Skoog (1997) refiere que la cromatografía líquida se clasifica según la interacción entre la fase estacionaria y el analito en:

Cromatografía de fase normal: Es un tipo de cromatografía líquida donde la fase estacionaria es polar, siendo lo más común el óxido de silicio hidratado (sílice) y la fase móvil presenta características no polares como el hexano. De esta manera los analitos no polares eluyen rápidamente, mientras que los polares quedan retenidos.

Cromatografía de fase reversa: La fase estacionaria está formada por grupos no polares unidos a la sílice como cadenas hidrocarbonadas C18 y C8 (octadecilo y octilo respectivamente) y la fase móvil consiste en mezcla de solventes polares (metanol, acetonitrilo y agua). Los analitos no polares quedan retenidos en la columna, mientras los polares eluyen fácilmente.

Componentes del HPLC.

- Fase Móvil
- Bomba.
- Sistema Inyector.
- Columna
- Detector
- Colector de Residuos.

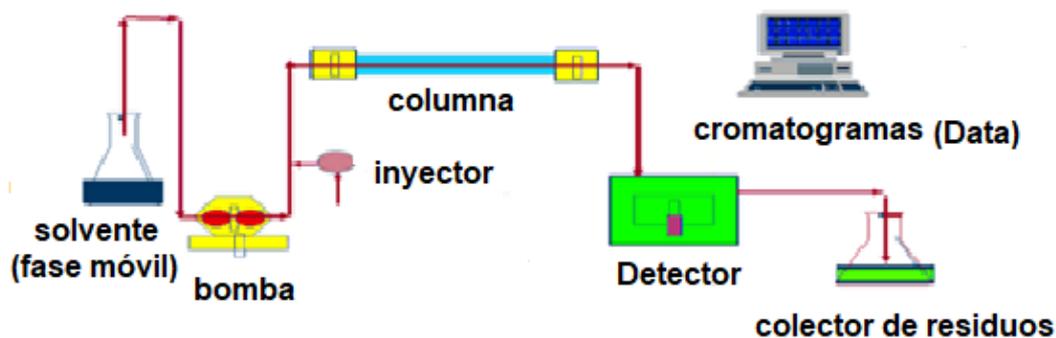


Figura 6. Componentes del HPLC.

Fuente. <http://www.metrixlab.mx/agua-ultrapura-para-la-analitica-hplc/>

2.2.2.6 Biosíntesis de las antocianinas.

Las antocianinas provienen de la ruta del ácido shikímico, al igual que otros tipos de compuestos fenólicos en las plantas. A partir de los intermediarios obtenidos de la glicólisis y de la ruta de la pentosa fosfato se obtiene al ácido shikímico y este es precursor de los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina. Este aminoácido da lugar al ácido cinámico mediante la eliminación de una molécula de amonio catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Luego dicha molécula formada entra en una reacción de condensación con 3 moléculas de malonil-CoA para dar origen a la chalcona, que luego mediante una hidroxilación en el C2 forma la estructura del catión flavilio (**figura 7**). Finalmente se estabiliza la molécula con una glucosilación, seguido de adiciones de grupos hidroxilos y otros sustituyentes (Ávalos y Pérez, 2009).

2.2.3 Antioxidantes

Un antioxidante actúa como agente reductor, capaz de retardar e inhibir la oxidación de un sustrato oxidable mediante la donación de sus electrones. (Londoño, 2012). El organismo humano puede sintetizarlos y también obtenerlos de diversas fuentes.

Clasificación de los antioxidantes:

Antioxidantes exógenos

Se obtiene mediante el consumo de alimentos como: vitamina E y C, carotenoides, flavonoides y otros.

Antioxidantes endógenos

Son biosintetizados por el organismo como las enzimas: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa; y también como biomoléculas: glutatión, ácido úrico, bilirrubina, carnosina.

2.2.4 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies químicas que poseen electrones desapareados en su capa de valencia, en los sistemas biológicos son muy reactivos capaces de formar otros RL en cadena e inestables con tiempo de vida muy corto.

Los RL se liberan continuamente en el organismo debido a las reacciones bioquímicas de oxido-reducción que ocurren en el metabolismo celular normal, siendo muy influenciadas por factores ambientales externos como: contaminantes ambientales, radiaciones, pesticidas, alimentación no adecuada, estrés, consumo de alcohol, tabaco y drogas. (Coronado *et al.*, 2015)

2.2.5 Especies reactivas del oxígeno (EROs)

Dentro de este grupo se incluye a los radicales libres como: radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Entre las EROS no radicales tenemos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl) (Londoño, 2012).

2.2.6 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es causado por el desequilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno). Este desbalance está vinculada a una serie de patologías como cáncer, hipertensión, diabetes, hipertensión arterial y enfermedades neurodegenerativas (Coronado *et al.*, 2015).

2.2.7 Actividad antioxidante

Es la capacidad de una sustancia de inhibir la degradación oxidativa. Para realizar su medición se emplean dos metodologías con diferentes fundamentos: métodos indirectos y directos. El primer método está determinado por la capacidad del antioxidante de estabilizar al radical libre como DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, etc. Sin embargo, el segundo método se basa en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, como el TBARS, que presenta gran relevancia biológica (Londoño, 2012).

2.2.7.1 Determinación de la actividad antioxidante. Las propiedades antioxidantes se demuestran por medio de ensayos químicos o biológicos.

Ensayos químicos para demostrar capacidad antioxidante:

- **DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).** El DPPH[•] es un radical estable, comercialmente disponible, posee un orbital semi-ocupado con un electrón desapareado que al reaccionar con un antioxidante permite estabilizar al radical. La decoloración de violeta a amarillo se mide espectrofotométricamente a 517 nm. Es un método sencillo, rápido y de bajo requerimiento instrumental. La desventaja que posee es que en su medición pueden existir interferencias, debido a que algunos antioxidantes presentan el mismo espectro de absorción del radical (Santacruz, 2011).

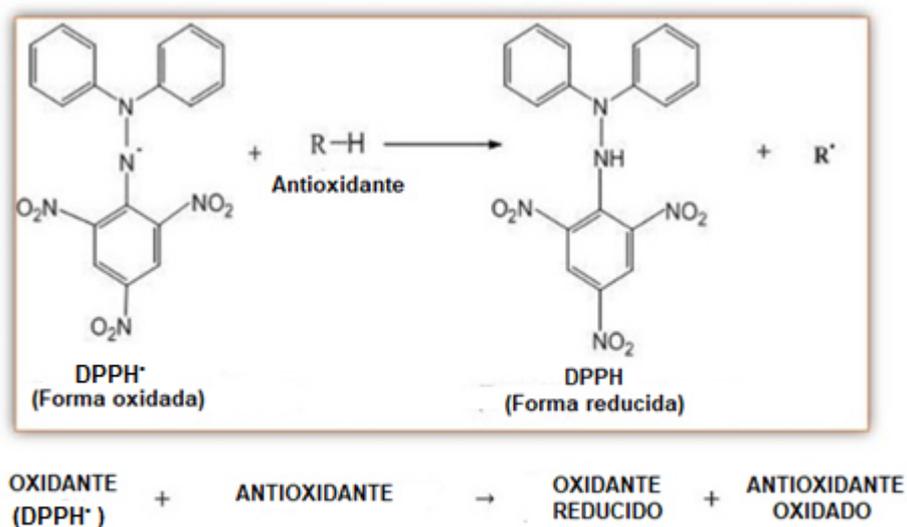


Figura 8. Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante

Fuente. Datos tomados de Zarabia (2015)

- **ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).** El radical catiónico ABTS^{•+} es preparado a partir de la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, es un compuesto de color verde azulado, el cual frente al antioxidante se decolora y su absorbancia

se mide espectrofotométricamente a 734 nm. Es el método más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas, debido a que su espectro de absorción es diferente, reduciendo la posibilidad de interferencia durante su medición (Santacruz, 2011).

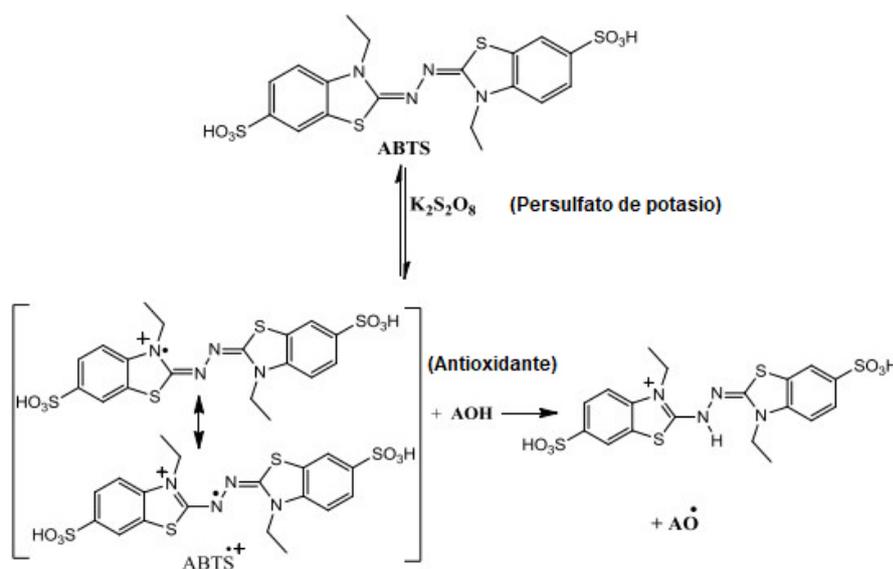


Figura 9. Formación del radical $ABTS^{\bullet+}$ y reacción con el antioxidante.

Fuente. Datos tomados de Zarabia (2015)

Ensayos biológicos para demostrar capacidad antioxidante

- **Lipoperoxidación (TBARS, MDA).** Es uno de los parámetros de estrés oxidativo más reportados en la literatura. El malondialdehído (MDA) es la principal especie reactiva al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y es generado por la oxidación de los ácidos grasos insaturados. La reacción se da en medio ácido y altas temperaturas, donde 1 mol de MDA reacciona con dos moles de TBA produciendo un complejo coloreado rosado y que es leído espectrofotométricamente a 535 nm. (Londoño, 2012)

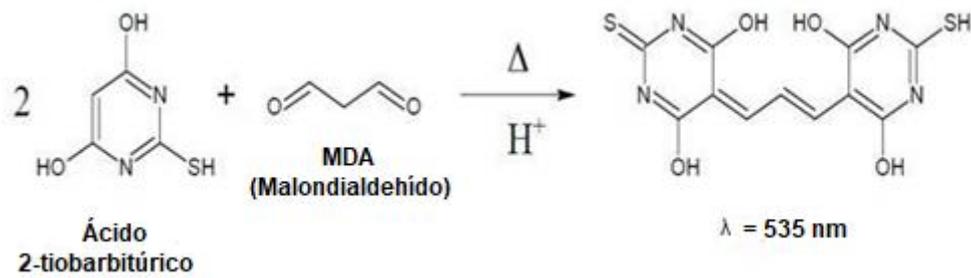


Figura 10. Reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico.

Fuente: <https://bioquochem.com/es/producto/kit-tbars-malondialdehido-mda>

El TBA reacciona con aldehídos que no necesariamente son generados como productos de la lipoperoxidación, pueden reaccionar con glucosa, ácido ascórbico y algunos aminoácidos como prolina, arginina y glutamato, por esta razón el análisis en fluidos biológicos por este método resulta ser complejo (Fagali, 2011), motivo por la que la literatura también refiere a la lipoperoxidación como TBARS cuando es ensayada con este reactivo.

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de estudio

- **Tipo de investigación:** Cuantitativo.
- **Diseño de la Investigación:** Observacional/analítico; comparativo.

3.2 Materiales y Equipos

3.2.1 *Materiales*

- Acetato de sodio. Scharlau.
- Cloruro de Potasio. Scharlau.
- Cianidina-3-glucósido. Sigma Aldrich.
- Alcohol etílico absoluto. Merck.
- Ácido clorhídrico. Fermont.
- Trolox. Sigma Aldrich
- Ácido Ascórbico. Fermont.
- Ácido Gálico. Sigma Aldrich.
- Quercetina. Sigma Aldrich.

3.2.2 *Equipos*

- HPLC Hitachi.
- Balanza Analítica OHAUS.
- Baño María BIOBASE.
- Potenciómetro METROHM.
- Espectrofotómetro UV-VIS. GENESYS.

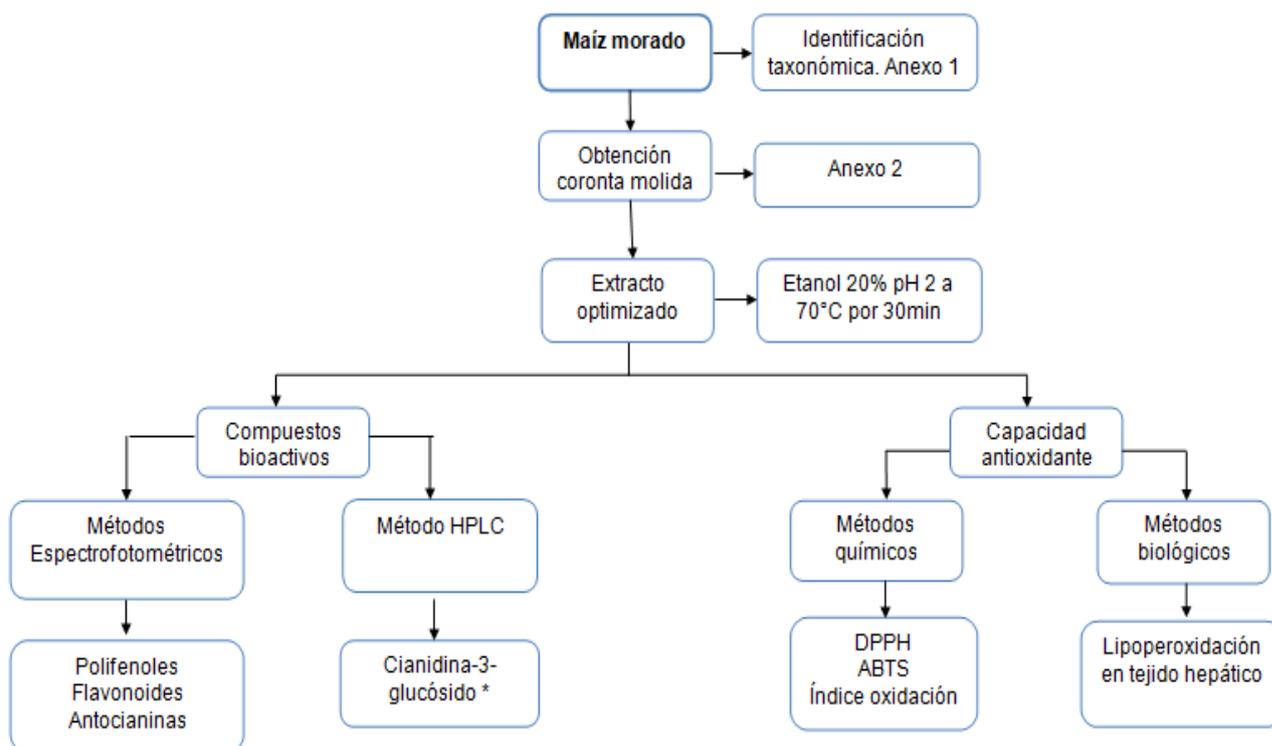
3.3 Material vegetal

Las corontas de maíz morado utilizados en la investigación, se obtuvieron de tres diferentes regiones del Perú:

- **Región Lima:** En el distrito de Pacarán provincia Cañete ubicado sobre los 700 msnm y recolectados en el mes de julio del 2017. Posee un clima cálido, seco y soleado permanentemente todo el año. Durante todo el desarrollo vegetativo del maíz morado la temperatura promedio fue de 22 °C, sin presencia de lluvias.

- **Región Apurímac:** En el distrito de Pichirhua provincia Abancay ubicado sobre los 2293 msnm y recolectado en el mes de marzo del 2018. Presenta un clima cálido y templado. Durante todo el desarrollo vegetativo la temperatura promedio fue de 19 °C, con presencia de lluvias.

- **Región Cajamarca:** En el distrito de Eduardo Villanueva provincia San Marcos ubicado sobre los 2007 msnm y recolectado en el mes de febrero del 2018. Posee un clima cálido y templado. Durante todo el desarrollo vegetativo la temperatura promedio fue de 16 °C, con presencia de lluvias.

Cuadro 3. Flujograma del proceso de la investigación.

*Extracto acuoso e hidroalcohólico.

3.4 Identificación taxonómica

La identificación de la coronta de maíz morado de la muestra de Lima fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) (**Ver anexo 1**).

3.5 Obtención de la coronta molida

Se realizaron las siguientes operaciones:

- Selección: Se efectuó manualmente, con el objetivo de separar las mazorcas que presentaban signos de deterioro.

- Limpieza: Se realizó el lavado con agua destilada facilitando la eliminación de los residuos presentes.
- Desgranado: Separación manual del grano de la mazorca, quedando así únicamente la coronta libre, listo para la siguiente operación.
- Corte: Con ayuda de un cuchillo se trató de reducir el tamaño de la coronta.
- Secado: Ésta operación se realizó en una estufa a 37 °C que duró tres días hasta peso constante.
- Molienda: Se realizó esta operación con una moladora doméstica, obteniéndose partículas gruesas, y por último se empleó una licuadora, que permitió obtener partículas más finas.
- Tamizado: Se empleó la malla N° 60 con un tamaño de poro de 250 µm para obtener partículas aún más finas, con el objetivo de aumentar la superficie de contacto.
- Almacenamiento: Finalmente fueron almacenados en frascos ámbar y colocados en un desecador.

Todo este procedimiento se encuentra resumido en el **anexo 2**.

3.6 Determinación de las condiciones óptimas para la obtención del extracto optimizado.

Se realizó un ensayo preliminar donde el extracto fue obtenido a partir de la coronta molida: solvente de extracción en una relación 1:100 (p/v). Se evaluaron los factores: tipo de solvente, temperatura y tiempo de extracción en varios niveles, para así optimizar la extracción de las antocianinas.

Según los resultados del **anexo 3 y 4**, las variables que permitieron obtener mayor contenido de antocianinas totales (**extracto optimizado**) de acuerdo al método de pH diferencial fueron:

Solvente de extracción: etanol 20% pH 2 (acidificado con HCl 2N)

Tiempo de extracción: 30 minutos.

Temperatura de extracción: 70°C.

Todos los extractos obtenidos fueron filtrados con papel whatman N° 42. La solución filtrada obtenida se empleó para todos los ensayos excepto en la determinación de cianidina-3-glucósido donde se emplearon ambos extractos (acuoso e hidroalcohólico) obtenidos a las condiciones de temperatura y tiempo del **extracto optimizado**.

Todos los ensayos fueron realizados en muestras independientes cada uno por triplicado.

3.7 Cuantificación de los compuestos bioactivos

3.7.1 Polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

La cuantificación de los polifenoles totales se realizó conforme al procedimiento de la organización internacional de estandarización ISO 14502-1 con algunas modificaciones.

Fundamento. El reactivo Folin-Ciocalteu (RFC) es una mezcla que contiene molibdato de sodio y wolframato de sodio en ácido fosfórico, de color amarillo, que en presencia de los polifenoles provoca su reducción a un complejo de color azul. La absorbancia es medida espectrofotométricamente a 765 nm.

Preparación de reactivos. Se preparó carbonato de sodio a una concentración de 75 mg/mL disuelto en agua bidestilada. El reactivo Folin-Ciocalteu se diluyó en una proporción de 1/10 (v/v) en el mismo solvente.

Preparación del estándar y la muestra. Se preparó una solución patrón de ácido gálico de 1000 µg/mL en etanol absoluto, como estándar. Luego se

realizaron las diluciones respectivas con agua bidestilada hasta obtener concentraciones en el rango de 5 a 100 µg/mL.

Para la muestra, el **extracto optimizado** fue diluido con el solvente de extracción a 0,5 mg/mL. Después de realizar el protocolo según el **cuadro 4** se dejó en reposo por 30 minutos a temperatura de ambiente y las lecturas de absorbancias fueron medidas a 765 nm.

Cuadro 4. Protocolo de determinación de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

	Tubo de Reacción (µL)	Blanco (µL)
Agua bidestilada	-	100
Muestra/estándar ácido gálico	100	-
RFC (10 % v/v)	500	500
Na ₂ CO ₃ (7,5 % p/v)	400	400

Cálculos. La concentración de ácido gálico en el extracto de maíz morado se obtuvo sustituyendo el valor de absorbancia de la muestra en la ecuación de la recta del estándar (ácido gálico).

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g muestra seca y se determinaron con la siguiente fórmula.

$$EAG = \frac{C_c}{C_m} = \frac{\text{mg de Ácido Gálico}}{\text{g de muestra seca}}$$

Donde:

EAG: Equivalente de ácido gálico.

Cc: Concentración en mg/L de ácido gálico presente en el extracto de coronta del maíz morado.

Cm: Concentración del extracto de coronta del maíz morado en g/L.

3.7.2 Flavonoides del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

La determinación del contenido de flavonoides se realizó según el procedimiento de Stalikas (2007) con algunas modificaciones.

Fundamento. El método se basa en que el catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides. El cambio de coloración a amarillo se midió espectrofotométricamente a 425 nm.

Preparación del reactivo. El tricloruro de aluminio se preparó a una concentración de 25mg/mL disuelto en etanol absoluto.

Preparación del estándar y muestra. Se preparó una solución patrón de quercetina de 500 µg/mL en etanol absoluto. Luego se realizaron las diluciones respectivas hasta obtener concentraciones en el rango de 5 a 150 µg/mL con el mismo solvente.

Para la muestra, el **extracto optimizado** fue diluido con el solvente de extracción a 7 mg/mL. Después de ejecutar el protocolo del **cuadro 5**, se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó a 425 nm.

Cuadro 5. Protocolo de determinación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

	Tubo de reacción (µL)	Blanco (µL)
Muestra/Estándar quercetina	100	-
Etanol	800	900
AlCl ₃ (2,5%)	100	100

Cálculos. El contenido de flavonoides se cuantificó a partir de la curva de calibración de quercetina, los resultados fueron expresados como mg equivalentes de quercetina (EQ)/g de muestra seca y se determinaron con la siguiente fórmula.

$$EQ = \frac{C_c}{C_m} = \frac{\text{mg de Quercetina}}{\text{g de muestra seca}}$$

Donde:

EQ: Equivalente de quercetina.

Cc: Concentración en mg/L de quercetina presente en el extracto de coronta del maíz morado.

Cm: Concentración del extracto de coronta del maíz morado en g/L.

3.7.3 Antocianinas totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

La metodología de pH diferencial fue descrita por Giusti y Wrositad (2001).

Fundamento. Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales debido al efecto del pH. La forma de oxonio predomina a pH 1, estructura

estable que origina un efecto protector sobre la molécula adquiriendo un color rojo intenso, y la forma hemiacetal a pH 4,5 inestable e incolora. El método permite de manera segura y rápida medir el contenido total de antocianinas monoméricas, incluso en presencia de pigmentos degradados, polimerizados y otros componentes interferentes. Las absorbancias fueron leídas a 510 nm y 700 nm.

Procedimiento. Del **extracto optimizado**, se tomó una alícuota de 2 mL y se enrasó en fiola de 20 mL con el solvente de extracción, una segunda dilución 1/5 (v/v) con soluciones buffer de cloruro de potasio (pH 1) y acetato de sodio (pH 4,5). Se realizaron las mediciones de absorbancias a 510 nm y 700 nm y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

$$\text{Antocianinas Totales} \frac{\text{mg}}{\text{g de muestra seca}} = \frac{A \times \text{PM} \times \text{FD} \times V}{\epsilon_{510} \times l \times W}$$

Donde:

PM: Peso molecular de 449,2 g/mol para cianidina-3-glucósido.

FD: factor de dilución.

l: longitud de paso de celda en cm

ϵ_{510} : 26900 M⁻¹cm⁻¹ coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido.

V: volumen mL del extracto de coronta del maíz morado.

W: peso en g de la muestra.

3.7.4 Cianidina-3-glucósido del extracto acuoso e hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Las condiciones de análisis fueron previamente descritas por Arriaga y Castro (2011).

Fundamento. El HPLC es un tipo de cromatografía líquida donde la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase

estacionaria. La separación cromatográfica se logra por medio de las interacciones que sufre el analito con la fase estacionaria y fase móvil.

Diluyente. Mezcla de etanol y agua en la proporción de (20:80) respectivamente, llevado a pH 2 con ácido clorhídrico 2N.

Preparación del estándar. Se preparó una solución patrón de cianidina-3-glucósido a una concentración de 1 mg/mL con diluyente. Luego se tomó una alícuota de 300 μ L de la solución patrón y se llevó a un volumen final de 10 mL con el diluyente.

Preparación de la muestra. Se utilizó tanto el extracto hidroalcohólico como el acuoso bajo las condiciones de tiempo y temperatura obtenido del extracto optimizado. A partir de ello, se tomó una alícuota de 2 mL y se enrasó con el diluyente a 10 mL.

Condiciones cromatográficas. La cuantificación de la cianidina-3-glucósido fue realizado en un cromatógrafo líquido con detector arreglo de diodos de la marca Hitachi Chromaster. Se utilizó una columna fase reversa Purospher STAR RP 18 5 μ m 4,6 x 250 mm y como fase móvil se empleó una solución A (ácido fórmico/agua/metanol en proporción de 1:4:5) y una solución B (ácido fórmico/agua en una proporción de 1:9), el gradiente de elución utilizado fue: 0 min 10 % A, 10 min 73 % A, 12 min 73 % A, 20 min 10 % A (**cuadro 6**). El tiempo de elución fue de 25 minutos a un flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 10 μ L, temperatura de la columna de 30 °C y fueron detectadas a una longitud de onda de 520 nm.

Cuadro 6. Gradiente de elución empleado para la cuantificación de cianidina-3-glucósido por HPLC.

A: (ácido fórmico/agua/metanol) B: (ácido fórmico/agua).

Tiempo (min)	Solución	
	A (%)	B (%)
0	10	90
10	73	23
12	73	23
20	10	90
25	10	90

Cálculos. Los resultados son expresados como mg de cianidina-3-glucósido por g de muestra seca y la determinación se realizó con la siguiente fórmula.

$$\text{cianidina} - 3 - \text{glucósido} \frac{\text{mg}}{\text{g de muestra seca}} = \frac{Am \times Cs \times P \times 1000}{As \times Cm}$$

Donde:

Am: Área de la muestra.

As: Área del estándar.

P: Potencia del estándar.

Cs: Concentración del estándar.

Cm: Concentración de la muestra.

3.8 Determinación de Capacidad Antioxidante

3.8.1 Captación de radical libre DPPH' del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Para determinar la capacidad antioxidante se procedió según el método realizado por Joyeux *et al.*, (1995) con algunas modificaciones.

Fundamento. El radical DPPH' posee un orbital semi-ocupado con un electrón desapareado que al reaccionar con un antioxidante gana un electrón que le permite completar su orbital y obtener una mayor estabilidad. La decoloración de violeta a amarillo se mide espectrofotométricamente a 517 nm y por diferencia se determina el porcentaje de inhibición del radical libre.

Preparación del reactivo. Se preparó una solución patrón de DPPH a 0,2 mg/mL en etanol absoluto, conservándose protegido de la luz y en refrigeración. Antes de cada uso se ajustó la absorbancia de la solución a $0,60 \pm 0,02$ a 517 nm.

Preparación de la muestra y de los estándares de referencias. Se emplearon como estándares de referencia al trolox y ácido ascórbico: Para ambos la solución patrón tuvo una concentración de 100 µg/mL en etanol absoluto. Luego se realizaron las diluciones respectivas en el rango de 4 a 20 µg/mL.

Para el caso de la muestra, el **extracto optimizado** fue diluido con el solvente de extracción hasta obtener concentraciones en el rango de 0,02-0,18 mg/mL. Finalmente se siguió con el protocolo del **cuadro 7** y después de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se realizaron las lecturas a 517 nm.

Cuadro 7. Protocolo de determinación de la capacidad antioxidante por DPPH del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

	Tubo de reacción (mL)	DPPH [*] inicial (mL)	Blanco (mL)
Muestra/estándar	0,4	-	-
Solvente muestra	-	0,4	0,4
DPPH	0,8	0,8	-
Solvente DPPH	-	-	0,8

Cálculos. El porcentaje de inhibición del radical DPPH^{*} se determinó con la siguiente expresión.

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

Donde:

Abs.control: Absorbancia del radical DPPH^{*}.

Abs.muestra: Absorbancia del radical DPPH^{*} después de agregar la muestra.

La concentración inhibitoria al 50% (IC 50) se calculó en base a la ecuación obtenida de graficar % inhibición del radical frente a concentración de las muestras provenientes de las tres regiones. Los resultados se expresaron como TEAC, actividad antioxidante equivalente a Trolox ($\mu\text{g}/\text{mg}$ muestra seca), y se determinaron con la siguiente fórmula:

$$TEAC_{DPPH} = \frac{IC50_{TROLOX}}{IC50_{MUESTRA}} = \frac{\text{ug trolox}}{\text{mg de muestra seca}}$$

También se expresaron como VCEAC, actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra seca) y se determinó con la siguiente ecuación:

$$VCEAC_{DPPH} = \frac{IC50_{\text{Ácido ascórbico}}}{IC50_{\text{MUESTRA}}} = \frac{\text{ug ácido ascórbico}}{\text{mg de muestra seca}}$$

3.8.2 Captación del radical catiónico ABTS^{•+} del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Para determinar la capacidad antioxidante se procedió según el método realizado por Re *et al.*, (1999) con algunas modificaciones.

Fundamento. Consiste en obtener el radical ABTS^{•+} a partir de la oxidación de ABTS con persulfato de potasio. El radical así formado presenta un intenso color verde azulado, que se decolora frente a un antioxidante. El cambio de coloración es medido espectrofotométricamente a 734 nm y por diferencia se determina el porcentaje de inhibición del radical libre.

Preparación del reactivo. La formación del radical ABTS se realizó mediante la reacción de persulfato de potasio (2,45 mM) con ABTS (7 mM). Para esto, se colocaron 3,3 mg de persulfato de potasio y 19,4 mg de reactivo ABTS para un volumen final de 5 mL con agua. La mezcla se agitó y se dejó reposar por 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Se ajustó la absorbancia de la solución a $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm antes de cada uso.

Preparación de los estándares de referencia y de la muestra. Se emplearon como estándares de referencia al trolox y ácido ascórbico: Para ambos casos la solución patrón tuvo una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol absoluto. Luego se realizaron las diluciones respectivas hasta obtener concentraciones que fueron del rango de 20 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para la muestra, el **extracto optimizado** fue diluido con el solvente de extracción hasta obtener concentraciones en el rango de 0,25 a 3,00 mg/mL.

Luego se siguió con el protocolo del **cuadro 8** y después de incubar en la oscuridad por 7 minutos se realizaron las lecturas a 734 nm.

Cuadro 8. Protocolo de determinación de la capacidad antioxidante por ABTS^{•+} del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

	Tubo de reacción (μL)	ABTS ^{•+} inicial (μL)	Blanco (μL)
Muestra/estándar	20	-	-
Solvente muestra	-	20	20
ABTS	980	980	-
Solvente ABTS	-	-	980

Cálculos. El porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} se determinó con la siguiente expresión.

$$\% \text{ inhibición ABTS} = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

Donde:

Abs. control: Absorbancia del radical ABTS^{•+}.

Abs. muestra: Absorbancia del radical ABTS^{•+} después de agregar la muestra.

El IC 50 se calculó en base a la ecuación obtenida de graficar % inhibición del radical frente a concentración.

Los resultados se expresaron como TEAC, o sea, actividad antioxidante equivalente a Trolox (μg/mg de muestra seca) y se determinaron con la siguiente fórmula:

$$TEAC_{ABTS} = \frac{IC50_{TROLOX}}{IC50_{MUESTRA}} = \frac{ug\ trolox}{mg\ de\ muestra\ seca}$$

También se expresaron como VCEAC, actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra seca) y se determinó con la siguiente ecuación:

$$VCEAC_{ABTS} = \frac{IC50_{\text{Ácido ascórbico}}}{IC50_{MUESTRA}} = \frac{ug\ \text{ácido ascórbico}}{mg\ de\ muestra\ seca}$$

3.8.3 Índice de oxidación del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Para determinar el índice de oxidación se procedió según el método realizado por Mex *et al.*, (2013).

Fundamento. Se basa en la reducción del ión Mn^{+7} del permanganato de potasio 0,1 N (color rojo grosella) a la forma iónica Mn^{+2} (color incoloro) por acción de los compuestos del extracto del maíz morado y que son detectados visualmente por su decoloración.

Procedimiento. El extracto optimizado fue diluido 10 veces con el solvente de extracción. Luego se mezcló 0,5 mL del extracto diluido con 500 μL de agua bidestilada y 1 mL de ácido sulfúrico al 20 %. Seguidamente se mezcló, se añadió 50 μL de permanganato de potasio 0,1 N, previamente estandarizado frente a oxalato de sodio, y finalmente se midió el tiempo de decoloración de rojo grosella a incoloro mediante el uso de un cronómetro.

3.8.4 Inducción de la lipoperoxidación en tejido hepático y TBARS

3.8.4.1 Inducción de la lipoperoxidación. Se trabajó con la metodología de Cytel (2001) con algunas modificaciones.

Fundamento: La degradación oxidativa de los lípidos es inducida por la presencia de hierro y ácido ascórbico, este sistema es responsable de la generación de los radicales libres que provocan la lipoperoxidación. Esto se debe a que el ácido ascórbico en altas concentraciones y en presencia de metales de transición como el hierro, funciona como prooxidante provocando la generación de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Gil, 2010). Donde el ácido ascórbico se oxida a ácido dehidroascórbico por acción del oxígeno, para generar peróxido de hidrógeno (Serra y Cafaro, 2007). El H_2O_2 , es un oxidante débil, pero en presencia de metales de transición genera un radical más reactivo $\text{OH}\cdot$, provocando la oxidación del Fe^{+2} a Fe^{+3} (Londoño, 2012).

Preparación del homogeneizado de hígado (HH). Después de realizar la decapitación de las ratas hotlzman anestesiadas con éter, se extrajo el hígado, el cual se perfundió con una solución cloruro de potasio (0,154 M). Luego fue cortado en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 g y homogenizado con una solución de buffer fosfato salino (BPS) pH 7,4 hasta obtener una concentración del 5 %. Todos los pasos se realizaron en el rango de temperatura de 4 a 10 °C.

Para el tratamiento de los animales se respetó las normas éticas para el tratamiento de animales de laboratorio, según la Ley de protección y Bienestar Animal N° 30407.

Preparación de la muestra. Del **extracto optimizado** se realizaron diluciones con el solvente de extracción hasta obtener 5 mg/mL.

Inducción de la lipoperoxidación. Se realizó conforme al **cuadro 9** y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Cuadro 9. Protocolo de inducción de la lipoperoxidación en tejido hepático.

	Basal	Control	c/estrés+EX	s/estrés+EX
HH (µL)	900	900	900	900
BPS (µL)	120	60	-	60
AA (4 mM) (µL)	-	45	45	-
FeSO ₄ (2 mM) (µL)	-	15	15	-
Extracto (EX) (µL)	-	-	60	60

AA: ácido ascórbico; EX (extracto de coronta molida); HH (homogeneizado de hígado); BPS: buffer fosfato salino; c/estrés (con estrés inducido); s/estrés (sin estrés inducido).

3.8.4.2 Determinación de especies reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

Se realizó por medición del complejo tiobarbitúrico - malondialdehído según el método de Buege y Aust (1978) con algunas modificaciones.

Fundamento. La lipoperoxidación (LP) es un daño oxidativo que afecta principalmente a los lípidos de membrana. Durante la LP se libera el malondialdehído (MDA) que forma un complejo con el ácido 2-tiobarbitúrico de color rosado en medio ácido y a altas temperaturas, el cual es medido a una longitud de onda de 535 nm.

Procedimiento. Después de 30 minutos de incubación la reacción fue detenida con ácido tricloroacético (TCA) al 10% conforme al **cuadro 10**. Finalmente el sobrenadante obtenido fue leído a 535 nm.

Cuadro 10. Protocolo de determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

	Basal	Control	c/estrés+EX	s/estrés+EX
HHt (μL)	300	300	300	300
TCA 10 % (μL)	600	600	600	600

Someter a baño hirviendo por 15 minutos, enfriar con agua de caño.

TBA 0,67 % (μL)	900	900	900	900
-----------------	-----	-----	-----	-----

Someter a baño hirviendo por 30 minutos, enfriar con agua helada, centrifugar a 7000 rpm por 10 minutos

HHt: Homogeneizado de hígado con tratamiento (inducción de estrés oxidativo); TCA: Tricloroacético; TBA (ácido 2-tiobarbitúrico); c/estrés (con estrés inducido); s/estrés (sin estrés inducido).

Cálculos. El nivel de lipoperoxidación se determinó mediante la fórmula:

$$TBARS \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g tejido}} \right) = \frac{FD \times A \times v}{\epsilon \times l \times w}$$

ϵ_{535} : Coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

A: Absorbancia de la muestra.

w: Peso del hígado en gramos.

v: Volumen del homogenizado del hígado en litros.

l : Ancho de la celda 1cm.

FD: Factor de dilución del homogenizado de hígado.

3.9 Análisis Estadístico

Todas las mediciones cumplieron con los requisitos previos para poder aplicar las pruebas paramétricas (distribución normal y homogeneidad de varianzas). El ANOVA se aplicó a todos los indicadores para definir si existe diferencias significativas entre las medias, luego se empleó la prueba Tukey con el fin de saber entre que pares de medias hay diferencias significativas. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico MINITAB 17.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de la Investigación

4.1.1 Cuantificación de compuestos bioactivos.

4.1.1.1 Polifenoles totales, flavonoides del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides se emplearon las curvas de calibración de ácido gálico ($y=0,09973x+0,01553$; $R^2=0,999$) y quercetina ($y=0,07399x+0,002938$; $R^2=0,999$) respectivamente (**anexo 5 y 6**).

En el **cuadro 11**, se presentan los resultados expresados como equivalente de ácido gálico (polifenoles) y equivalente de quercetina (flavonoides); en ambos la muestra de Lima fue la que presentó el mayor contenido de polifenoles y flavonoides con 94,09 mg EAG/g y 4,43 mg EQ/g respectivamente.

Cuadro 11. Polifenoles totales, flavonoides y antocianinas del extracto hidroalcohólico de la coronta de maíz morado de tres regiones del Perú.

Procedencia	Polifenoles mg EAG/g	Flavonoides mg EQ/g	Antocianinas mg/g
Lima	94,09 ± 2,03 ^a	4,43 ± 0,24 ^a	42,64 ± 0,249 ^a
Cajamarca	75,39 ± 1,68 ^b	3,59 ± 0,06 ^b	34,09 ± 0,210 ^b
Apurímac	67,85 ± 2,20 ^c	3,09 ± 0,11 ^c	24,41 ± 0,267 ^c

Muestras independientes por triplicado; media ± desviación estándar.

^{a, b y c}: Valores con letras diferentes en una misma columna expresan significancia para la prueba Tukey $p < 0,05$. **EQ**: Equivalente de quercetina (flavonoides); **EAG**: Equivalente de ácido gálico (polifenoles).

4.1.1.2 Antocianinas totales del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

En el mismo **cuadro 11** se observa los valores promedios del contenido de antocianinas totales usando el método de pH diferencial en las muestras obtenidas de las tres diferentes regiones existiendo diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$), correspondiendo el mayor valor la muestra de Lima con 42,64 mg/g.

4.1.1.3 Cianidina-3-glucósido del extracto acuoso e hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Se realizó una comparación del contenido de cianidina-3-glucósido empleando un extracto hidroalcohólico y acuoso (**cuadro 12**). Los valores de cianidina-3-glucósido fueron mayores con el sistema de extracción hidroalcohólico, de todas las muestras de maíz morado la muestra de Lima fue la que presentó el mayor valor con 18,50 mg/g (extracto hidroalcohólico) y 13,71 mg/g (extracto acuoso).

Cuadro 12. Contenido de cianidina-3-glucósido por HPLC en coronta de maíz morado de tres regiones del Perú usando extracto hidroalcohólico y acuoso.

Procedencia	Cianidina-3-glucósido (mg/g)	
	acuoso	hidroalcohólico
Lima	13,71 ± 0,15 ^a	18,50 ± 0,16 ^a
Cajamarca	8,16 ± 0,01 ^b	10,30 ± 0,10 ^b
Apurímac	6,68 ± 0,01 ^c	9,46 ± 0,14 ^c

Muestras independientes por triplicado; media ± desviación estándar.

^{a, b y c}: Valores con letras diferentes en una misma columna expresan significancia para la prueba Tukey $p < 0,05$.

En la **figura 11 y 12** se muestran los perfiles cromatográficos del extracto hidroalcohólico y acuoso de las tres muestras, siendo estos parecidos en el número de picos, variando sólo en la proporción de cada antocianina. Los picos predominantes fueron 1 y 3, el primero fue identificado comparando el tiempo de retención con el del estándar cianidina-3-glucósido, para finalmente determinar su concentración en base a sus áreas respectivas.

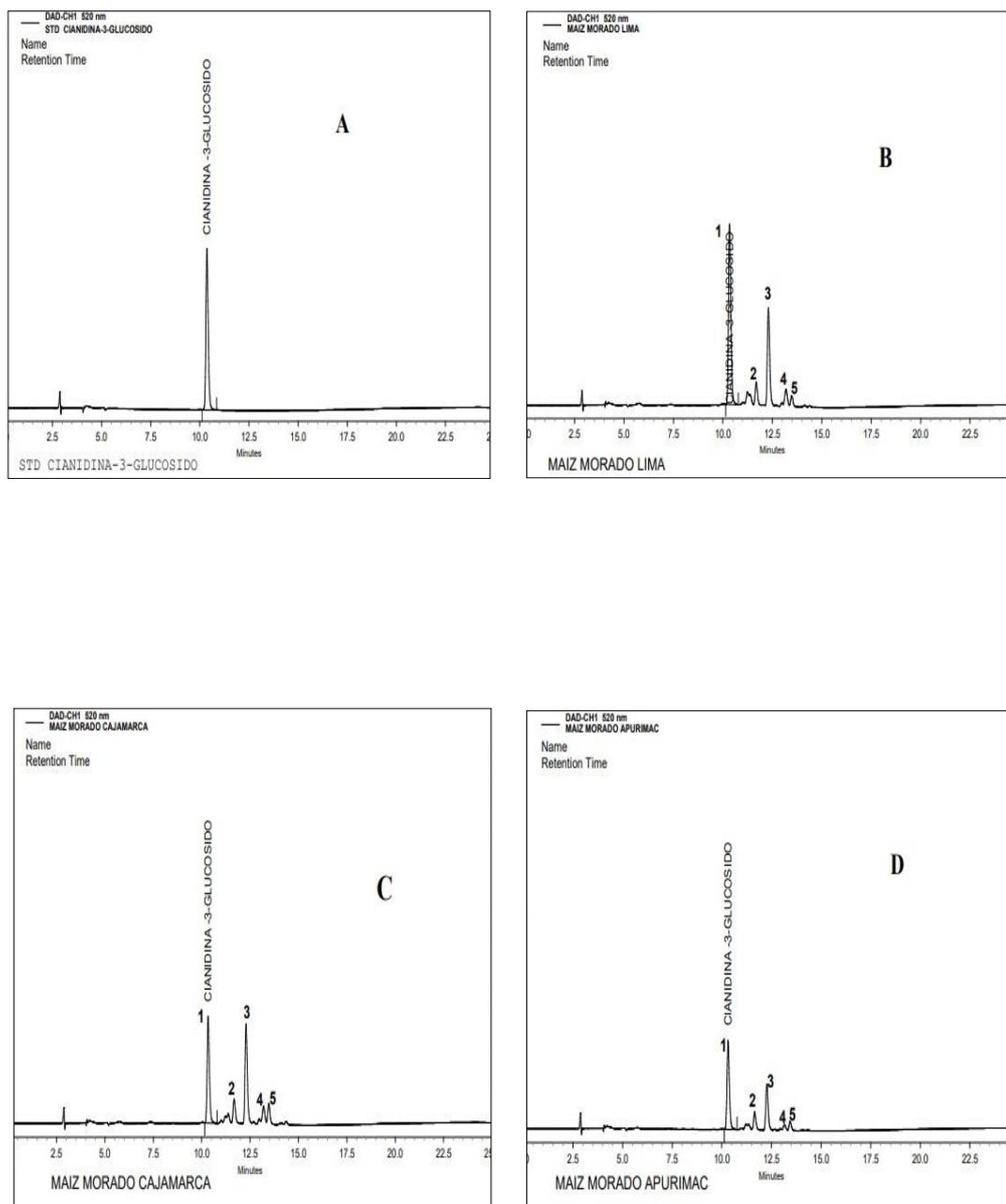


Figura 11. Cromatogramas obtenidos por HPLC del extracto hidroalcohólico de coronta de maíz morado. A) Estándar de cianidina-3-glucósido B) Perfil obtenido del extracto de Lima C) Perfil obtenido del extracto de Cajamarca D) Perfil obtenido del extracto de Apurímac.

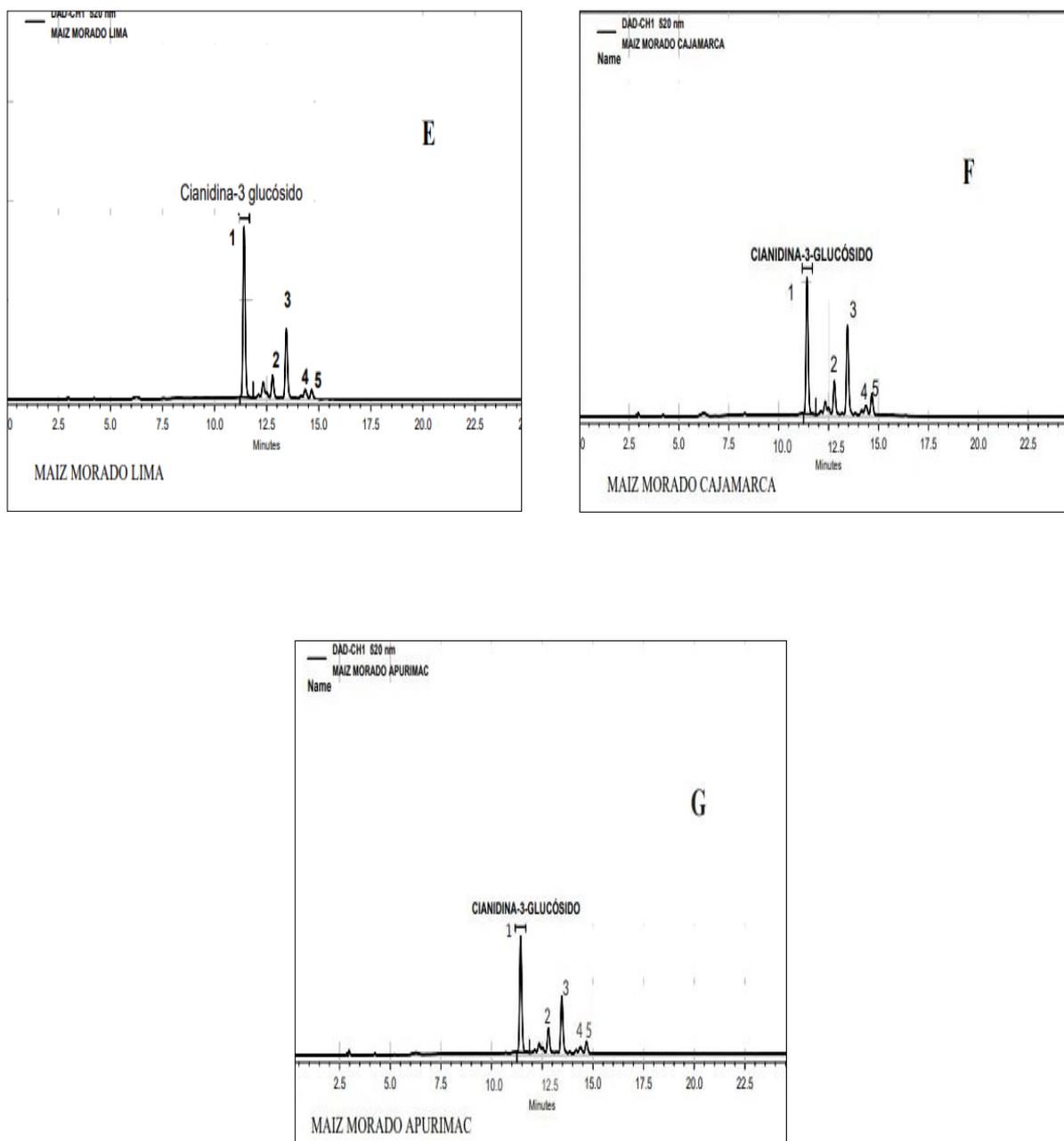


Figura 12. Cromatogramas obtenidos por HPLC del extracto acuoso de coronta de maíz morado. E) Perfil obtenido del extracto de Lima F) Perfil obtenido del extracto de Cajamarca G) Perfil obtenido del extracto de Apurímac.

4.1.2 Determinación de capacidad antioxidante

4.1.2.1 Captación del radical libre DPPH[•] del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Para la determinación de la capacidad antioxidante en las diferentes muestras de maíz morado por el método de DPPH se realizaron dos curvas de calibración empleando como estándares de referencia al trolox y al ácido ascórbico (**anexo 7 y 8**). Teniendo en cuenta las ecuaciones de regresión lineal, se determinó el concentración inhibitoria al 50 % (IC 50), dando como resultado 3,39 $\mu\text{g/mL}$ para el trolox ($y=15x-0,9$; $R^2=0,999$) y 3,74 $\mu\text{g/mL}$ para el ácido ascórbico ($y=13,68x-1,209$; $R^2=0,995$).

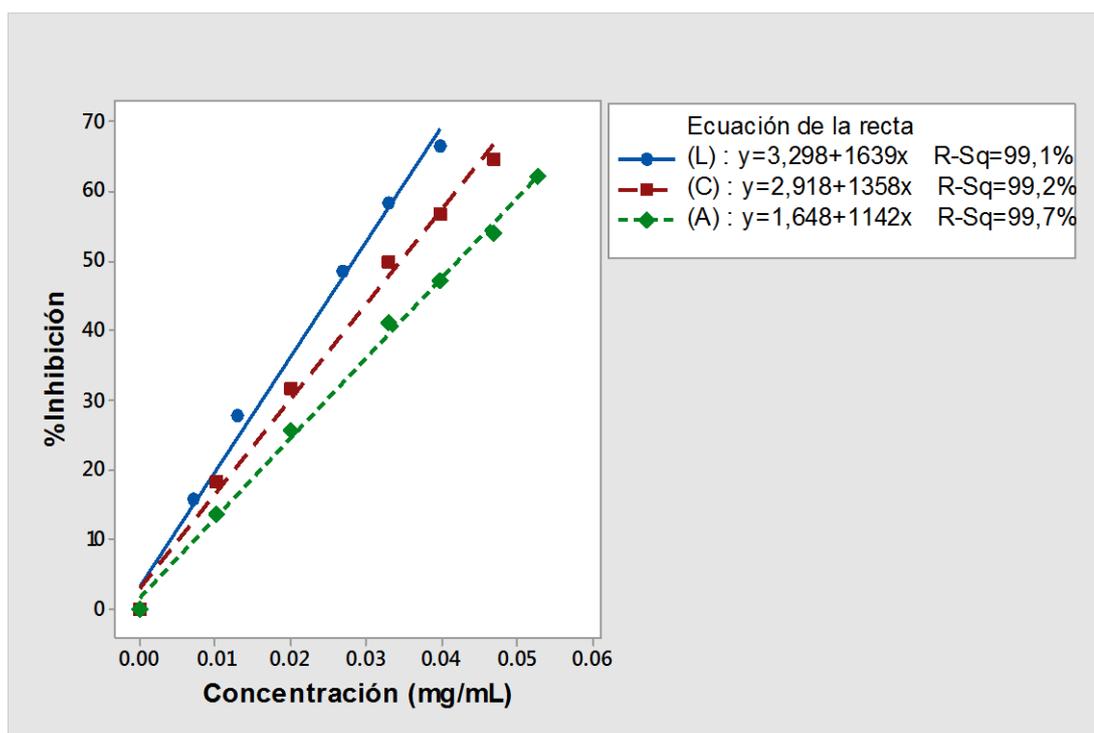


Figura 13. Porcentaje de inhibición por el método DPPH obtenido de las diferentes muestras (L) Lima (C) Cajamarca y (A) Apurímac.

La **figura 13** muestra el comportamiento lineal entre el % de inhibición y la concentración de las muestras provenientes de las tres regiones, observándose que a medida que aumenta la concentración del extracto

aumenta el % de inhibición. En base a la ecuación de la recta se obtuvieron los valores de IC 50:

$$\text{Lima: } y=3,298+1639x; R^2=0,991;$$

$$\text{Cajamarca: } y=2,918+1358x; R^2=0,992;$$

$$\text{Abancay: } y=1,648+1142x; R^2=0,997.$$

En el **cuadro 13** se observa que el extracto de Lima posee el menor valor de IC 50 (28,67 $\mu\text{g/mL}$) y por lo tanto la mayor capacidad de estabilizar al radical libre.

4.1.2.2 Captación del radical catiónico ABTS^{•+} del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS se realizaron dos curvas de calibración empleando como estándares de referencia al trolox y al ácido ascórbico (**anexo 9 y 10**). En base a las ecuaciones de regresión lineal se determinó el concentración inhibitoria al 50 % (IC 50), dando como resultado 3,19 $\mu\text{g/mL}$ para el trolox ($y=15,79x-0,306; R^2=0,997$) y 2,42 $\mu\text{g/mL}$ para el ácido ascórbico ($y=20,25x+1,071; R^2=0,996$).

Al trabajar las muestras de las tres regiones, se obtuvo un comportamiento cuadrático entre el % de inhibición del radical ABTS^{•+} y la concentración de las muestras (**Figura 14**). Se aplicaron las siguientes ecuaciones para la obtención de los valores de IC 50:

$$\text{Lima: } y = 0,831+2312x-15468x^2; R^2 = 0,999;$$

$$\text{Cajamarca: } y = 2,001+1881x-12128x^2; R^2 = 0,997;$$

$$\text{Abancay: } y = 0,222+1654x-9971x^2; R^2 = 0,999).$$

Los valores de IC 50 se muestran en el **cuadro 13**. Al igual que los resultados obtenidos con DPPH, la muestra de Lima presentó el menor valor con 25,67 $\mu\text{g/mL}$ y por ende la mayor capacidad antioxidante.

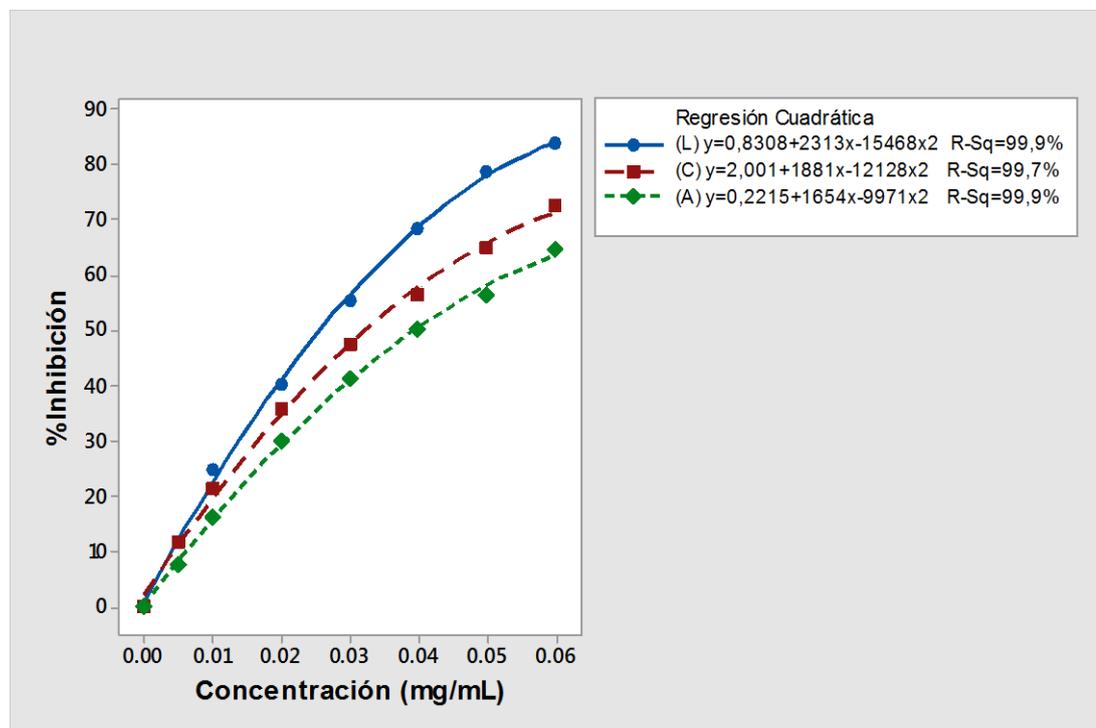


Figura 14. Porcentaje de inhibición por el método ABTS obtenido de las diferentes muestras (L) Lima (C) Cajamarca y (A) Apurímac

Según el **cuadro 13**, para ambas metodologías (DPPH y ABTS), es la muestra de Lima que presenta los mayores valores de TEAC y VCEAC expresándonos una excelente actividad antioxidante. Además expresan diferencias significativas $p < 0,05$ entre las muestras de diferentes regiones.

Se realizó la correlación de pearson (r) entre los compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides, antocianinas y cianidina-3-glucósido) y la capacidad antioxidante determinada por dos metodologías ABTS y DPPH, donde se encontró una correlación lineal negativa y significativa entre las antocianinas totales y el IC 50-DPPH ($r = -0,999$; $p = 0,030 < 0,05$), lo mismo se observa con el IC 50-ABTS ($r = -1,000$; $p = 0,005 < 0,05$) (**anexo 11**).

Cuadro 13. Capacidad antioxidante e IC 50 del extracto hidroalcohólico de coronta de maíz morado de tres regiones del Perú.

Procedencia	TEAC (µg/mg)		VCEAC (µg/mg)		IC 50 (µg/mL)	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
Lima	118,29± 2,41 ^a	124,33± 2,83 ^a	130,50±2,66 ^a	94,32±2,15 ^a	28,67 ± 0,58 ^a	25,67 ± 0,58 ^a
Cajamarca	97,81±1,65 ^b	98,68±1,74 ^b	107,90±1,82 ^b	74,86±1,32 ^b	34,67 ± 0,58 ^b	32,33 ± 0,58 ^b
Apurímac	79,46±1,08 ^c	80,43±1,18 ^c	87,67±1,20 ^c	61,02±0,90 ^c	42,67 ± 0,58 ^c	39,67 ± 0,58 ^c

Muestras independientes por triplicado: media ± desviación estándar.

^{a, b y c}: Valores con letras diferentes en una misma columna expresan significancia para la prueba Tukey p<0,05.

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a trolox.

VCEAC: Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico.

4.1.2.3 Índice de oxidación del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado.

Los extractos de coronta de maíz morado presentaron valores de índice de oxidación entre 20,33 a 55,0 segundos, siendo la muestra procedente de Lima la que mostró un gran poder reductor, debido a que dicho extracto logró rápidamente reducir al permanganato de potasio de estado de oxidación (+7) a (+2) cambiando la coloración de rosado a incoloro en menor tiempo. Los datos fueron evaluados estadísticamente en un análisis de varianza (ANOVA) indicando que existe diferencias significativas ($p < 0,05$) y según el método Tukey los tres promedios son estadísticamente diferentes. **(Cuadro 14)**

Cuadro 14. Índice de oxidación del extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado de tres regiones del Perú.

Procedencia	Tiempo (s)
Lima	20,33 ± 1,53 ^a
Cajamarca	47,00 ± 2,65 ^b
Apurímac	55,00 ± 2,65 ^c

Muestras independientes por triplicado; media ± desviación estándar.

^{a, b, c}: Valores con letras diferentes en una misma columna expresan significancia para la prueba Tukey.

4.1.2.4 Determinación de especies reactivas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

En nuestro estudio la Lipoperoxidación (LP) es estimulada cuando el ácido ascórbico se encuentra en presencia de trazas de metales de transición como el hierro. Los valores más altos de TBARS lo presenta el

homogenizado de hígado tratado con hierro y ácido ascórbico, ambos responsables de una rápida lipoperoxidación. Sin embargo, cuando la LP se realiza en presencia de los extractos de maíz morado (EX), se observa una disminución de los valores de TBARS.

En la **figura 15**, el grupo basal está constituido por homogeneizado de hígado y buffer fosfato salino, a pesar de no existir lipoperoxidación inducida presenta niveles de TBARS (0,113 $\mu\text{mol/g}$), indicando presencia de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

El grupo (c/estrés+ EX) lo conforma el homogeneizado de hígado expuesto al sistema ácido ascórbico/ Fe^{+2} con adición del extracto de coronta de maíz morado. En la **figura 15** se observa que las tres muestras en estudio redujeron los niveles de TBARS del control, sin embargo la muestra de Lima (c/estrés+EX) a una concentración final de 49 $\mu\text{g/mL}$ logró disminuir significativamente los niveles de TBARS en un 53 % respecto al control, demostrando así mayor actividad antioxidante que las demás muestras.

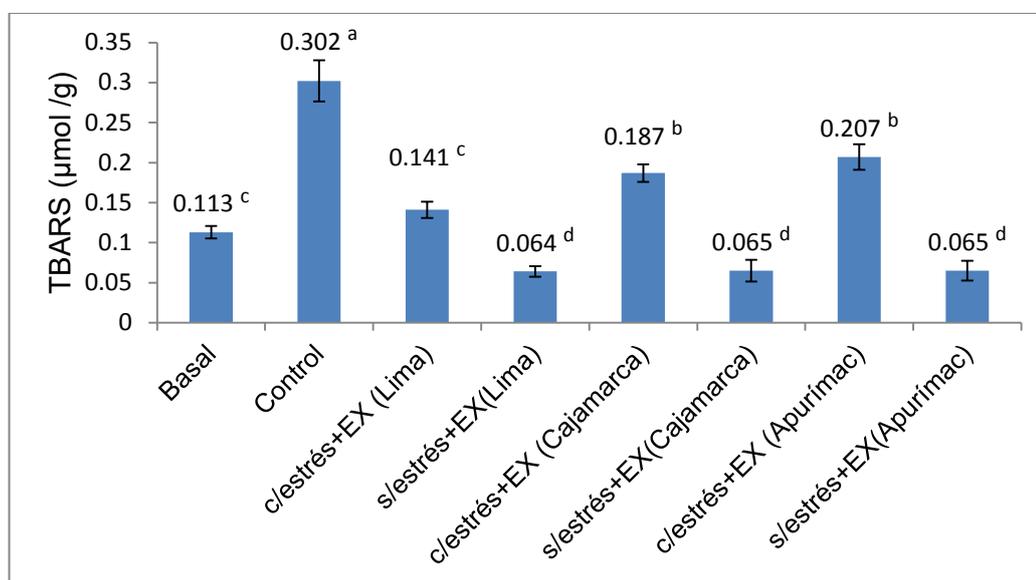


Figura 15. Contenido de TBARS frente al extracto hidroalcohólico de coronta del maíz morado de tres regiones del Perú en un modelo de estrés oxidativo *in vitro*, en homogeneizado de hígado.

a, b, c, d :Valores con letras diferentes expresan significancia al nivel de 0,05.
EX: Extracto, c/estrés: con estrés inducido, s/estrés: sin estrés inducido.

El grupo (s/estrés + EX) muestra la acción del extracto frente al estrés preexistente en el homogeneizado de hígado, donde se observa una disminución significativa de los niveles de TBARS de 42 a 43 % para los tres diferentes extractos respecto al grupo basal.

4.2 Discusión

4.2.1 Compuestos bioactivos en el extracto de la coronta del maíz morado.

El contenido de los metabolitos secundarios en el maíz morado dependerá de varios factores como las condiciones ambientales del cultivo. En el **cuadro 11** se observa el contenido de los compuestos bioactivos de las tres regiones seleccionadas, observándose que la muestra de Lima posee el mayor contenido seguido de la muestra de Cajamarca y Apurímac. Ésta diferencia podría explicarse porque los cultivos de maíz morado se realizaron en diferentes épocas del año.

Las zonas de mayor incidencia de radiación solar y UV-B se encuentran en los andes peruanos, pero en época de verano empieza a llover en la sierra y éstas nubes son muy gruesas y espesas que no permiten fácilmente que ingrese la radiación solar (SENAHMI, 2017).

El maíz morado de Cajamarca y Abancay fueron cultivados entre los meses de noviembre a marzo con presencia de lluvias y alta nubosidad provocando que gran parte de la radiación solar sea reflejada (Alley, 2007). En cambio para la muestra de Lima (Pacarán) su cultivo se realizó entre los meses de marzo a julio en ausencia de lluvias, con cielo despejado que permite el ingreso de la radiación solar, también tomar en cuenta que el clima soleado de dicho distrito se mantiene durante todo el año.

Según Carrasco (2009), ésta misma radiación solar puede ser perjudicial en altas intensidades donde se da el aumento de la radiación UV-B. Las plantas desarrollan una serie de mecanismos de adaptación a dicha radiación con el fin de evitar su penetración como: reducción de su crecimiento, aumento del contenido de ceras que favorecen su reflexión, aumento en la síntesis de metabolitos secundarios como los polifenoles capaces de absorber la radiación UV-B. Este mismo autor menciona que a dosis elevadas de

radiación UV-B inhibe el proceso de la fotosíntesis provocando la pérdida de los polipéptidos localizados en el fotosistema II, afectando la producción de ATP y NADPH que son los elementos esenciales en la fijación del CO₂ en el ciclo de Calvin.

Otro estudio realizado por Copia *et al.*, (2012) mostraron el efecto de la radiación UV-B sobre los polifenoles de una microalga, donde indicó que su respuesta está asociada aún fenómeno llamado Hormesis caracterizado por estimulación a bajas dosis e inhibición a altas dosis. Cuando la dosis de UV-B son moderadas favorece la fotosíntesis y aumento de los polifenoles como mecanismo de protección y a dosis elevadas inhibe la fotosíntesis y con ello disminuye el contenido de polifenoles.

Otro de los factores a considerar es el tipo de suelo, el cultivo de maíz morado requiere de suelos franco-arenosos con estructura granular, blanda con buen drenaje, aireación y buena retención de humedad (INIA, 2016). Además este recurso vegetal necesita de gran cantidad de fertilizantes que contengan Nitrógeno, Fósforo y Potasio que permitan aumentar la producción de las antocianinas. En la etapa inicial de su crecimiento requiere de altas concentraciones de fósforo, y en una etapa posterior a inicios de su floración no requiere de este elemento (INIA, 2016).

Con lo anteriormente mencionado, estos factores probablemente serían los principales motivos de porqué la muestra procedente del distrito de Pacarán, provincia Cañete, región Lima, presentó los valores más altos en compuestos bioactivos; específicamente este distrito posee un clima seco, cálido y soleado durante todo el año con temperatura promedio de 22 °C, con suelos fértiles, franco-arenosos y aluviales.

Otros autores evaluaron el contenido de polifenoles en coronta de maíz morado como Gorriti *et al.*, (2009) quienes trabajaron con una muestra procedente del distrito de la Joya de la Región de Arequipa-Perú utilizando el mismo solvente de extracción del presente trabajo (solución etanólica al 20%, pH 2), pero bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura de

extracción. Para las condiciones de temperatura y tiempo de extracción de 75 °C y 30 minutos alcanzaron el valor de 73,80 mg EAG/g de coronta y para la temperatura de 90 °C y tiempo de 120 minutos el valor de 76,96 mg EAG/g de coronta. Siendo este último valor similar a lo conseguido con el maíz morado de Cajamarca del presente estudio pero en condiciones de extracción de 70 °C y 30 minutos. Al comparar las ubicaciones geográficas y climatológicas de los distritos de La Joya (Arequipa) y de Eduardo Villanueva (Cajamarca) se puede notar que tienen similar clima durante el año, pero el distrito arequipeño se ubica a 1644 msnm mientras que el distrito cajamarquino a 2007 msnm. Probablemente la altitud y las condiciones de cultivo serían las responsables de esta diferencia.

Además, Quispe *et al.*, (2011) realizaron un estudio de tres cultivares de coronta de maíz morado TC (testigo Canta), TJ (Testigo Joya) y la variedad PM 581, sembrados en el distrito de La Joya-Arequipa, y consideraron las condiciones del campo de cultivo: El suelo de textura franco arenosa, con bajos contenidos de materia orgánica y nitrógeno, elevadas cantidades de fósforo disponible, valores normales de potasio y carbonato de calcio, y la fertilización en el experimento fue de 230 kg N/ha a los 45 días después de siembra. El contenido de fenoles totales para los tres cultivares estuvieron en el rango de 33,39 a 40,58 mg EAG/g coronta. Los resultados del presente trabajo son mayores a los reportados por Quispe *et al.* Esto se explicaría por las condiciones agroecológicas durante el cultivo que pueden afectar el contenido de los polifenoles, que según el INIA (2016) el tipo de suelo que permite el buen desarrollo del maíz morado debe poseer altos contenidos de materia orgánica y altas concentraciones de N, P y K (siembra).

También se ha reportado estudios del contenido de polifenoles en el grano de maíz morado. El trabajo realizado por Ramos *et al.*, (2012), con los granos de maíz morado de la variedad mejorada, INIA-601 cultivada en la región de Cajamarca-Perú y con seis sistemas de extracción, mostró valores de polifenoles en el rango de 4,63 a 9,06 mg EAG/g, y en cuanto a flavonoides fueron de 1,15 a 2,66 mg ER/g (equivalente de rutina). Por su parte, Mex *et al.*, (2013), trabajaron con los granos de cinco variedades de

maíces cultivados en México, donde determinaron que la variedad morada obtuvo el mayor valor de polifenoles con 14,45 mg EAG/g. En ambas investigaciones sus resultados fueron inferiores a los de la coronta de maíz morado de nuestra investigación, lo cual indicaría que en la coronta se concentra el mayor contenido de estos compuestos bioactivos. Con relación al contenido de flavonoides, nuestros resultados fueron obtenidos utilizando quercetina como referencia, no siendo posible un análisis comparativo en equivalencia con el trabajo de Ramos *et al*, ya que los autores utilizaron rutina como referencia.

Doroteo *et al.*, (2013) realizaron estudios sobre el maíz morado y otras plantas peruanas, han reportado polifenoles y flavonoides respectivamente de la uña de gato (17,3 mg EAG/g y 79,39 mg EQ/g), del maíz morado (33,2 mg EAG/g y 48,40 mg EQ/g), del yacón (12,8 mg EAG/g y 27,21 mg EQ/g), de la maca (9,3 mg EAG/g y 14,66 mg EQ/g), ratania (30,1 mg EAG/g y 127,87 mg EQ/g) y aguaymanto (9,4 mg EAG/g y 12,72 mg EQ/g), comparando estos resultados con el presente estudio, los valores son mayores en contenido de polifenoles, pero menores en la determinación de flavonoides, esto último se explicaría porque empleamos una técnica diferente que emplea tricloruro de aluminio y no implica la adición de nitrito de sodio y que las lecturas fueron realizadas a 425 nm y no a 510 nm.

Las antocianinas son los responsables del color característico del maíz morado y forman parte del grupo de los polifenoles (Cuevas *et al.*, 2008).

En nuestro país existe información sobre la determinación de antocianinas en muestras procedentes de Cajamarca y de Arequipa. Resultados reportados por Rafael (2017) y Gorriti *et al.*, (2009) bajo condiciones de extracción similares a las desarrolladas en la presente investigación muestran valores de antocianinas de 8,71 mg/g y 25,94 mg/g respectivamente. Para el primer caso, la obtención de la coronta de maíz morado fue en el mercado de Cajamarca y no se conocen las condiciones de cosecha, recolección y almacenamiento que pudieran haber influido en la estabilidad de las antocianinas ya que Guzmán *et al.*, (2010), menciona que

la luz solar y sobre todo la temperatura pueden dar lugar a la hidrólisis del enlace glucosídico (posición 3) seguido de la ruptura del anillo y como efecto, formación de chalconas. Los valores más altos de antocianinas de la presente investigación podrían explicarse porque las muestras seleccionadas fueron obtenidas tres días después de su cosecha e inmediatamente tratadas y almacenadas adecuadamente. Para el segundo se justificaría por las diferentes condiciones ambientales del cultivo.

Por otro lado, Quispe *et al.*, (2011) con muestras obtenidas de Arequipa, reportaron valores de contenido de antocianinas entre 13,36 a 20,60 mg/g, que fueron extraídas con etanol al 20 % pH 2 durante un tiempo de 60 minutos a la temperatura de 90 °C, estos valores están por debajo de lo encontrado en el presente estudio. Debemos mencionar que en este trabajo se ensayó la influencia del tiempo y temperatura (**Anexo 3 y 4**) y se observó que a mayores valores de 70 °C y 30 minutos, el contenido de antocianinas disminuye. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Gu *et al.*, (2007) donde demostraron que las antocianinas a temperaturas por encima de los 70 °C se degradan siguiendo una cinética de primer orden y que dicha degradación térmica ocasiona la hidrólisis del enlace glucosídico, ruptura del anillo pirilio y formación de chalconas incoloras.

Ramos *et al.*, (2012) al determinar antocianinas en granos de maíz morado procedente de Cajamarca, consiguieron valores de 0,88 a 2,87 mg/g. Asimismo, Mex *et al.*, (2013) trabajaron sobre el extracto hidroalcohólico de los granos de maíz morado consiguiendo el valor de 4,10 mg/g. El mayor valor obtenido en el presente estudio se explicaría debido a que la muestra fue la coronta del maíz morado, donde se concentra el mayor contenido de antocianinas, comparado con los granos de dicho fruto, hecho que fue confirmado por Arriaga y Castro (2011).

Los resultados obtenidos por HPLC para la cuantificación de la cianidina-3-glucósido mostraron que los perfiles cromatográficos del extracto acuoso e hidroalcohólico de las tres muestras son parecidos, variando sólo en la proporción de cada antocianina. Según el **cuadro 12**, puede observarse que

la mayor cantidad de cianidina-3-glucósido se logra empleando el extracto hidroalcohólico. Esto tendría su explicación en el tipo de solvente de extracción utilizado, ya que el etanol posee un carácter anfipático capaz de permeabilizar mejor la membrana plasmática, alterando su fluidez, facilitando así la salida de una mayor cantidad de antocianinas que se hallan en las vacuolas de las células vegetales (Elvir, 1993).

Al observar los perfiles cromatográficos logrados con HPLC en las tres muestras de maíz morado seleccionadas para este trabajo, se puede notar que los picos predominantes fueron 1 y 3. Según Pedreschi y Cisneros (2007), la cianidina-3-glucósido representa el principal tipo de antocianina presente en el extracto comercial de maíz morado obtenido de Lima, seguido por la cianidina-3-glucósido acilada. Asimismo, Cuevas *et al.*, (2008) investigaron sobre la caracterización de las antocianinas en granos de diferentes variedades de maíz boliviano, donde identificaron a la cianidina-3-glucósido y cianidina-3- (6"- malonilglucósido) como las mayoritarias, lo que concordaría con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Los resultados de HPLC del presente trabajo (**cuadro 12**) son comparables con los obtenidos por Arriaga y Castro (2011) quienes en un extracto acuoso encontraron que la variedad identificada con el nombre de Sintético Amplio presentó en coronta el valor de 30,84 mg/g. El menor valor conseguido en este trabajo podría explicarse por la variedad y las condiciones de cultivo, entendiéndose que las semillas mejoradas obtenidas por el INIA cuentan con gran número de genes que regulan la formación de las antocianinas (INIA, 2004).

Pedreschi y Cisneros (2007) determinaron el contenido de cianidina-3-glucósido de una muestra comercial proporcionada por Fitofarma (Lima), encontrando el valor de 15,43 mg/g, dato inferior al valor de la muestra de Lima mostrada en este trabajo. Es necesario indicar que la muestra comercial correspondió a un extracto hidroalcohólico seco atomizado de maíz morado, mientras que en el presente estudio trabajamos con las

corontas del maíz morado bajo condiciones de laboratorio y condiciones de extracción diferente, lo que justificaría nuestro alto valor.

4.2.2 Capacidad antioxidante en el extracto de la coronta del maíz morado.

En este estudio los extractos de maíz morado de las tres muestras tuvieron valores con diferencia significativa, el menor valor ha sido para la muestra proveniente de la región Lima, lo que significa una mejor capacidad antioxidante por ambas técnicas empleadas. Pero debe observarse de manera importante que los valores de IC 50 hallados para las tres muestras por ambas técnicas están por debajo de 50 $\mu\text{g/mL}$, lo que demuestra la alta capacidad antioxidante (Omisore *et al.*, 2005) (**cuadro 13**).

Este trabajo se propuso aplicar más de un método para el estudio de esta actividad con la finalidad de alcanzar un mejor entendimiento y certeza de la capacidad antioxidante de las muestras seleccionadas. Además, la mayoría expresa sus resultados como IC 50 y no como TEAC y VCEAC.

En el caso de la muestra procedente de la región Lima, también presentó el mayor contenido de los compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides, antocianinas y cianidina-3 glucósido). Estos resultados permiten proponer que los compuestos fenólicos presentes en el extracto aportan capacidad antioxidante inhibiendo la acción de los radicales libres.

Ramos *et al.*, (2012) trabajaron sobre el extracto metanólico de los granos de maíz morado encontrando los siguientes valores: para DPPH un IC 50 de 78 $\mu\text{g/mL}$ y para ABTS un IC 50 de 366 $\mu\text{g/mL}$. Los menores valores del presente trabajo hace referencia que necesitamos una menor cantidad del extracto para poder inhibir el 50 % del radical DPPH, mostrando así una considerable actividad antioxidante. Quizás la explicación a esa diferencia sea que en el presente estudio empleamos la coronta donde se sabe que se concentra el mayor contenido de los compuestos fenólicos, que en el grano.

Caso contrario es el trabajo realizado en granos de maíz morado por Mex *et al.*, (2013), donde el extracto frente al radical DPPH mostró un IC 50 de 17,3 µg/mL. El mayor valor de IC 50 conseguido en el presente estudio, a pesar de trabajar en las corontas, se justificaría por la diferente metodología de extracción, tomando en cuenta que la proporción de los solventes pueden favorecer a una mayor extracción de los metabolitos secundarios. Sin embargo, en el estudio de Doroteo *et al.*, (2013) sobre el extracto hidroalcohólico de maíz morado encontró un valor de IC 50 de 28,89 µg/mL similar al valor de la muestra de Lima del presente trabajo, a pesar de poseer menor contenido de polifenoles.

Otros productos naturales, como la uña de gato y la ratania fueron estudiados por Doroteo *et al.*, (2013). Su capacidad antioxidante fue evaluado con el método de DPPH y sus extractos hidroalcohólicos mostraron valores de IC 50 de 12,05 µg/mL para el uña de gato y 10,45 µg/mL para la ratania. Estos resultados muestran una mayor capacidad antioxidante a pesar de poseer menores contenidos de polifenoles que las muestras del presente estudio. Esta notable diferencia podría explicarse por las diferentes condiciones de extracción, ya que empleamos una menor proporción del solvente orgánico, y por la presencia de otros compuestos bioactivos que no son compuestos fenólicos pero que poseen actividad antioxidante como el ácido ascórbico.

Existen trabajos que expresaron su capacidad antioxidante como TEAC-DPPH y ABTS, como el trabajo realizado por Pichardo (2019) sobre un extracto hidroalcohólico de col morada que tuvo un valor de TEAC-ABTS de 7,21 mmol/100 g muestra seca y TEAC-DPPH de 4,31 mmol/100 g muestra seca. Para poder comparar se realizó la conversión de unidades obteniéndose los valores de TEAC-DPPH en el rango 31,74 a 47,24 mmol/100 g muestra seca y TEAC-ABTS entre 32,13 a 49,65 mmol/100 g muestra seca. La mayor capacidad antioxidante conseguido en el presente trabajo se demostraría por el elevado contenido de polifenoles y antocianinas comparado con la col morada.

Yábar (2019) determinó capacidad antioxidante sobre un extracto metanólico de tres ecotipos de maca (roja, amarilla y negra) y que fueron expresados como TEAC-ABTS, dando valores en el rango de 23,48 a 25,84 $\mu\text{mol/g}$ de muestra seca. Valencia *et al.*, (2017) trabajaron sobre extractos hidroalcohólicos de 24 accesiones de semillas de quinua sobresaliendo los valores de TEAC-DPPH de 1195,75 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ y TEAC-ABTS de 1507,94 $\mu\text{mol}/100\text{g}$. Además, Corimayhua (2017) reportó que el extracto hidroalcohólico de hojas de quinua presentan actividad antioxidante demostrado por los valores de TEAC-DPPH de 6414,35 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ y TEAC-ABTS de 5009,97 $\mu\text{mol}/100\text{g}$. Al realizar la conversión de las unidades de la presente investigación se obtuvieron como TEAC-DPPH en el rango de 31741,95 a 47242,03 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ y TEAC-ABTS entre 32128,10 a 49650,24 $\mu\text{mol}/100\text{g}$, los valores altos conseguidos en este trabajo se explicarían por su alto contenido de polifenoles capaces de inhibir la acción de los radicales.

La capacidad antioxidante demostrada con ambas metodologías DPPH y ABTS puede deberse al contenido de las antocianinas, debido a que presenta una correlación alta y significativa cercana a 1, por ejemplo entre DPPH-IC₅₀ y antocianinas ($r = -0,999$; $p < 0,05$). Asimismo, hay investigaciones que relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de polifenoles como el de Gorriti *et al.*, (2009) donde obtuvieron una correlación lineal altamente significativa ($r^2 = 0,9774$ $p < 0,01$), sin embargo en la presente investigación la correlación es alta pero no significativa. Además, Ramos *et al.*, (2012) determinaron el coeficiente de Pearson entre el IC 50 (DPPH y ABTS) y el contenido de compuestos bioactivos (antocianinas, polifenoles, y flavonoides) de los granos de maíz morado, donde obtuvieron una correlación negativa no significativa, por ejemplo entre el IC 50-DPPH y las antocianinas ($r = -0,626$; $p > 0,05$). Por otro lado, Kuskoski *et al.*, (2005) evaluaron la capacidad de antioxidante de once frutos y demostraron que la correlación es alta ($r^2 = 0,995$ método VCEAC-ABTS) cuando las muestras poseen antocianinas (mora, uva, fresa) y disminuye ($r^2 = 0,599$ método VCEAC-ABTS) cuando no hay presencia de dichos pigmentos (piña, graviola, maracuyá).

El índice de oxidación representa una medida de la velocidad de reducción de los compuestos oxidantes; un tiempo menor es indicativo de una mayor capacidad reductora. Los resultados conseguidos en este trabajo reportaron nuevamente a la muestra de Lima con mayor poder reductor (20,33 segundos) que las muestras de Cajamarca y Apurímac. Mex *et al.*, (2013) realizaron el índice de oxidación en granos de diversas variedades de maíces mexicanas, donde el maíz morado obtuvo el valor de 14,61 segundos. En el presente trabajo obtuvimos mayores valores de tiempo que indicarían una menor capacidad reductora, siendo explicado porque empleamos condiciones de extracción diferentes, además es posible que también influya la concentración del permanganato de potasio.

El ensayo de TBARS como expresión de lipoperoxidación (Londoño, 2012), ha mostrado inhibición significativa ($p < 0,05$) de la lipoperoxidación *in vitro* en las tres muestras de corontas de maíz morado cuando han sido enfrentadas a homogeneizado de hígado sometido a estrés oxidativo (**Figura 15**), esto sugiere que los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la coronta del maíz morado estarían inhibiendo la lipoperoxidación inducida bajo el sistema ácido ascórbico/ Fe^{+2} .

A pesar de no existir lipoperoxidación inducida, el grupo (s/estrés+EX) (**figura 15**) de las tres muestras de maíz morado provocaron la disminución de los niveles de TBARS del grupo basal ($p < 0,05$). Demostrándonos que los extractos no inducen reacciones prooxidantes en el homogeneizado de hígado, todo lo contrario, puede observarse un papel antioxidante protector aún en situaciones fisiológicas. La literatura refiere la doble función de algunos flavonoides como antioxidantes y prooxidantes (Pérez, 2003).

La muestra de Lima (**figura 15**) exhibió mayor actividad antioxidante debido a que logró inhibir la lipoperoxidación en un 53 % respecto al control y fue el que obtuvo los valores más altos en compuestos bioactivos. Esto indicaría que probablemente los compuestos fenólicos son los responsables de inhibir la degradación oxidativa (lipoperoxidación). Resultados semejantes fueron hallados en el trabajo de Arroyo *et al.*, (2007) quienes evaluaron la

capacidad antioxidante *in vivo* en ratas hipercolesterolémicas, a las que se les administró un extracto atomizado de maíz morado provocando una disminución significativa (56,4 %) de los niveles de lipoperoxidación en suero. Asimismo Ramos *et al.*, (2012) trabajaron sobre los granos de maíz morado y demostraron una alta actividad antioxidante capaz de reducir la lipoperoxidación en un 83 % en homogenizado de hígado. Otra fuente de recurso vegetal como la sachapapa morada logró inhibir la lipoperoxidación en un 66,37 % sobre suero humano (Ramos *et al.*, 2010), demostrando así, actividad antioxidante, y que podría estar relacionado por la presencia de sus compuestos fenólicos y sobre todo de las antocianinas debido a que este pigmento es responsable del color característico de estos recursos vegetales.

También es importante mencionar que se trabajó sobre un extracto hidroalcohólico y que podría haber arrastrado otros compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico que no forma parte de los compuestos fenólicos y que su presencia en el maíz morado está demostrado por Doroteo *et al.*, (2013).

Finalmente, los tres extractos hidroalcohólicos de coronta de maíz morado de tres regiones demuestran una gran capacidad antioxidante *in vitro* tanto con pruebas químicas como biológicas que se correlaciona con el contenido de compuestos fenólicos. La proveniente de la región Lima (Pacarán) presentó los valores más altos en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante, que podrían ser explicadas por diversos factores, entre estos tenemos, las condiciones edafológicas, agronómicas, climáticas, la diversidad genética entre otros.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

- Los compuestos bioactivos polifenólicos (flavonoides, antocianinas), de los tres extractos hidroalcohólicos de coronta tienen niveles significativamente diferentes, siendo la muestra procedente de Lima (Pacarán) la que obtuvo los valores más altos.
- La muestra de Lima (Pacarán) presentó los mayores valores en contenido de cianidina-3-glucósido, como antocianina de referencia.
- Las corontas del maíz morado de las muestras analizadas mostraron una buena actividad antioxidante evaluada *in vitro* mediante los ensayos químicos con DPPH y ABTS y el ensayo biológico medido a través de las TBARS.
- La muestra de la región Lima (Pacarán) exhibió significativamente la mayor actividad antioxidante y mayor cantidad de compuestos bioactivos *in vitro* tanto en el empleo de métodos directos (biológicos) e indirectos (químico).

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

Determinar los niveles de lipoperoxidación en estudios *in vivo* con la muestra que obtuvo el mayor contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante *in vitro*.

Determinar la actividad de las enzimas endógenas como catalasa, peroxidasa total y la superóxido dismutasa.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA

Alley, R.B. (2007). *El cambio climático: pasado y futuro*. Madrid, España: Siglo XXI España Editores.

Álvarez, E., y Orallo, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *OFFARM*, 22(10), 130-140.

Arriaga, B., y Castro, I. (2011). *Determinación de la concentración de cianidina-3-glucósido por cromatografía líquida de alta resolución en Zea mays L." maíz morado" procedente del Instituto Nacional de Innovación Agraria* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

Arroyo, J., Raez, E., Rodríguez, M., Chumpitaz, M., Burga, J., De la Cruz, W., y Valencia, J. (2007). Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays L.*) en ratas hipercolesterolémicas. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*, 24(2), 157-162.

Arroyo, J., Raez, E., Rodríguez, M., Chumpitaz, V., Burga, J., De la Cruz, W., y Valencia, J. (2008). Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de Maíz morado (*Zea mays L.*) en ratas. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*, 25(2), 195-99.

Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2 (3), 119-145.

Borja, K. (2013). *Efecto gastroprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de Mutsia acuminata R. & P. chinchilcuma* (Tesis de Pregrado). Universidad Wiener, Lima, Perú.

Bueje, J.A., Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52(1), 302-310.

Carrasco, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *IDESIA*, 27 (3), 59-76.

Copia, J., Gaete, H., Zúñiga, G., Hidalgo, M., Cabrera, E. (2012). Efecto de la radiación ultravioleta-B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella sp.* *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40 (1), 113-123.

Corimayhua, S. (2017). *Optimización de los parámetros de extracción de compuestos fenólicos totales de hojas de quinua (Chenopodium quinoa Willd.)*. (Tesis de pregrado). Universidad Peruana Unión, Lima, Perú.

Coronado, M., Gutiérrez, R., Vásquez, M., Radilla, C., y Vega, S. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev. Chil Nutr*, 42(2), 206-212.

Cuevas, E., Antezana, A., y Winterhalter, P. (2008). Análisis y caracterización de Antocianinas en diferentes variedades de Maíz Morado (*Zea Mays L.*) Boliviano. *Memorias Red-Alfa Lagrotech*. 79-95.

CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (2001). RIVAPLAMED. Red de validación de Plantas Medicinales. Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales.

Doroteo, V.H., Díaz, C., Terry, C., y Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Sociedad Química del Perú*, 79 (1), 13-20.

Drago, M.E., López, M., Sainz, T.D. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58-68.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, 13 (1), 79-106.

Elias, J., y Gamero, D. (1988). *Obtención de colorante a partir del maíz morado* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.

Elvir, J.R. (1993). Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Cidbimena*, 61 (1), 20-24.

Fagali, N.S. (2011). *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: Efecto de antioxidantes*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina.

Flores, D. (2008). *Zea Mays L. variedad morada y su efecto protector de daño osteoarticular en artritis inducida en ratas* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Fossen, T., Slimestad, R., Andersen, O.M. (2001). Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J Agric Food Chem*, 49(5), 2318-2321.

García, M.A. (2016). *Nuevas estrategias analíticas de extracciones selectivas en continuo acopladas a la cromatografía de líquidos para la determinación de antibióticos en muestras biológicas* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, España.

Garzón, G.A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. *Acta biológica colombiana*. 13 (3), 27-36.

Gil, A. (2010). *Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Madrid, España: Médica Panamericana.

Giusti, M.M., Wroslad, R.E. (2001). Characterization and measurements of anthocyanins by UV-VIS spectroscopy. *In Current protocols in Food Analytical Chemistry*. F1.2.1-F.2.13.

Gorriti, A., Arroyo, J., Negron, L., Jurado, B., Purizaca, H., Santiago, I., Taype, E., y Quispe, F. (2009). Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado *Zea mays*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y Aromáticas*.8 (6), 509-518.

GRC (Gobierno regional de Cajamarca). (2019). *Cajamarca registra más de 2 mil hectáreas de cultivo de maíz morado*. Recuperado de <https://www.regioncajamarca.gob.pe/portal/noticias/det/90>.

Gu, Z., Han, Y., Yang, Z., Fan, G., y Chen, Z. (2007). Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Elsevier*, 9(3), 341-347.

Guillén, J., Mori, S., y Paucar, L.M. (2014). Características y propiedades funcionales del maíz morado (*Zea mays* L.) var. Subnigrovioláceo. *Scientia Agropecuaria*, 5, 211-217.

Guzmán, M., Ortega, A., y Anaya, C. (2010). Piranoantocianinas modificaciones estructurales de antocianinas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(1), 84-95.

INEI. (2012). *Condiciones de riesgos cardiovasculares*. Recuperado de <https://www.inei.gob.pe>.

INIA. (2016). *Guía de producción comercial de maíz morado*. Cajamarca. Perú.

Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, A., y Mortier, F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta med*, 61(2), 126 - 129.

Justiniano, E. (2010). *Fenología e intensidad de color en corontas del maíz morado (Zea Mays L.) en sus diferentes estados de desarrollo en la localidad de la molina* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., García, M.C., Troncoso, A.M., y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and technology*, 24(4), 691-693.

Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment*, 25(4), 726-732.

Kyle, J.A.M., Duthie, G.G. (2006). *Flavonoids in foods*. Recuperado de <http://blogs.cimav.edu.mx/daniel.glossman/data/files/Libros/Flavonoids%20-%20Chemistry,%20Biochemistry%20and%20Applications.pdf>

Lagouge, M., y Larsson, N.G. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine*, 273 (6), 529-543.

Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medirla actividad*. Recuperado de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>.

Martínez, C., y Carbajal, A. (2012). *Manual práctico de nutrición y salud*. Madrid, España.

Mex, R.M.J., Bolívar, N.J., Garma, P.M., Tut, J.A., y Romero, K.I. (2013). Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(6), 558-571.

MINAGRI. (2017). *Maíz morado*. Recuperado de <http://repositorio.minagri.gob.pe/>.

Moreno, G.E. (2011). *Metodología analítica para validar cianidina-3-glicósido en el maíz morado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 41(5), 1523–1542.

OMS. (2013). *Información general sobre hipertensión en el mundo*. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/87679>.

Omisoré, N.O.A., Adewunmi, C.O., Iwalewa, E.O., Ngadjui, B.T., Adenowo, T.K., Abegaz, B.M., Ojewole, J.A, Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Braz J Med Biol Res*, 38 (7), 1087–1094.

Patras, A., Brunton, P.N., Donnell, C., y Tiwari, B.K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Elsevier*, 21 (1), 3-11.

Pedreschi, R., y Cisneros, L. (2007). Phenolics profiles of andean purple corn (*Zea mays L.*). *Food Chem*, 100, 956-963.

Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 22 (1), 48-57.

Pichardo, F.F. (2019). *Obtención de pigmentos bioactivos a partir de col morada (Brassica oleracea var. Capitata) y evaluación de su aplicación en un producto alimenticio* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del estado de México, México.

Pinedo, R. (2015). *Niveles de fertilización en dos variedades de maíz morado (Zea Mays L.) en la localidad Canaán-Ayacucho* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Pozo, J. (2012). *Maíz morado una alternativa de producción competitiva para el departamento de Apurímac*. Recuperado de [https://dokumen.tips / documents](https://dokumen.tips/documents).

Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27 (1), 76-89.

Quispe, F., Arroyo, K., y Gorriti, A. (2011). Características morfológicas y químicas de 3 cultivares de maíz morado (*Zea mays L.*) en Arequipa-Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 73 (3), 205-217.

Rafael, E. (2017). *Extracción y Cuantificación de Antocianinas de maíz morado (Zea mays L.) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.

Ramos, F., Muñoz, A.M., Alvarado, C., y Yáñez, J. (2010). Antocianinas, Polifenoles, actividad antioxidante de sachapapa morada (*Dioscorea trifida L.*) y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. *Rev Soc Quím Perú*, 76(1), 61-71.

Ramos, F., Muñoz, A.M., Alvarado, C., y Yáñez, J. (2012). Purple corn (*Zea mays L.*) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *J Med Food*, 15(2), 206-215.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.

Salhuana, W. (2004). Diversidad y descripción de las razas de maíz del Perú. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/356993546/Diversidad-y-razas-de-maiz-en-Peru-pdf>.

Salinas, Y., Pérez, J.J., Vásquez, G., Aragón, F., Vásquez, G.A. (2012). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays L.*) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolita. *Scielo*, 46(7), 693 -706.

Salinas, Y., García, C., Coutiño, B., Vidal, V. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(3), 285 -294.

Sánchez, V., Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161-168.

Santacruz, L.A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

SENAMHI. (2017). *Niveles de radiación UV se incrementan en todo el país*. Recuperado de <https://andina.pe/Agencia/noticia-la-radiacion-uv-alcanza-valores-moderados-y-extremos-la-sierra-669954.aspx>

Serra., H.M y Cafaro., T.A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana*, 41 (4), 525-532.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler. (1997). *Fundamentos de química analítica*. Barcelona, España: Reverté.

Stalikas, C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*, 30 (18), 3268-3295.

Valencia, Z., Cámara, F., Ccapa, K., Catacora, P., Quispe, F. (2017). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de quinua peruana (*chenopodium quinoa* W.). *Rev Soc Quím Perú*, 83 (1), 16-28.

Xu, J.W., Ikeda, K., Yamori, Y. (2004). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cianidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension*, 44(2), 217-222.

Yábar, E., Chirinos, R., Campos, D. (2019). Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp) durante la pre-cosecha, cosecha y secado natural post-cosecha. *Scientia Agropecuaria*, 10(1), 85-97.

Yang, Z., Zhai, W. (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 169-176.

Zarabia, M.H. (2015). *Actividad antioxidante y citoprotectora del extracto acuoso de tres morfotipos de Solanum spp." Papa nativa" in vitro*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica del maíz morado de Lima.



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 09-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (mazorca), recibida de **Ana María CCACCYA CCACCYA**; químico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: **Zea mays L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: LILIOPSIDA

SUB CLASE: COMMELINIDAE

ORDEN: CYPERALES

FAMILIA: POACEAE

GENERO: Zea

ESPECIE: Zea mays L.

Nombre vulgar: "Maíz morado"

Determinado por: Bigo. María Isabel La Torre Acuy

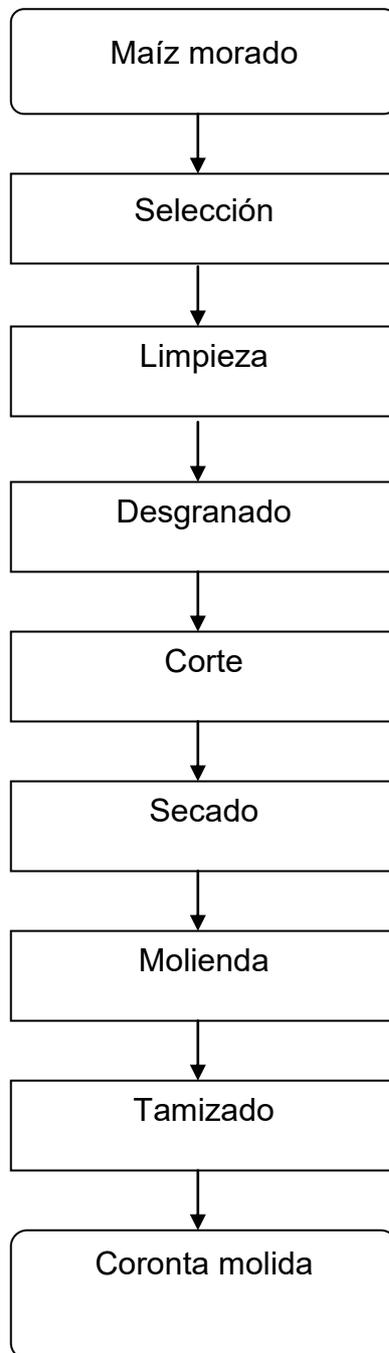
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 10 de enero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
 JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/yhr.

Anexo 2. Flujograma de las operaciones necesarias para la obtención de la coronta molida.



Anexo 3. Contenido de antocianinas según factores de solvente y temperatura de extracción en coronta de maíz morado.

Solvente	Temperatura (°C)	Antocianinas (mg/g)
Agua	25	28,68 ± 0,20 ^a
	50	34,06 ± 0,28 ^b
	70	39,50 ± 0,61 ^c
	100	31,97 ± 0,18 ^d
Etanol 20 %	25	34,62 ± 0,31 ^a
	50	43,61 ± 0,14 ^b
	70	46,86 ± 0,62 ^c
	100	38,61 ± 0,02 ^d

Muestras independientes por triplicado; media ± desviación estándar.

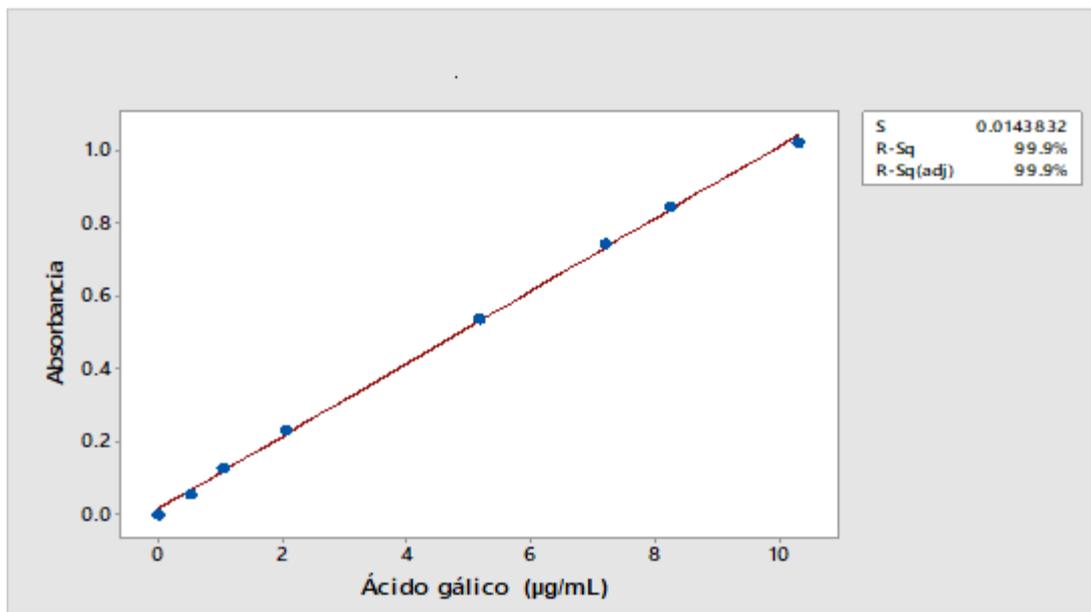
^{a, b, c y d}: Valores con letras diferentes en una misma columna expresan significancia para la prueba Tukey.

Anexo 4. Contenido de antocianinas según factores de solvente y tiempo de extracción en coronta de maíz morado.

Solvente	Tiempo (min)	Antocianinas (mg/g)
Agua	30	39,25 ± 0,42 ^a
	60	37,75 ± 0,56 ^b
	120	33,77 ± 0,16 ^c
	240	31,85 ± 0,11 ^d
Etanol 20%	30	46,03 ± 0,47 ^a
	60	43,83 ± 0,44 ^b
	120	42,22 ± 0,31 ^c
	240	41,33 ± 0,74 ^d

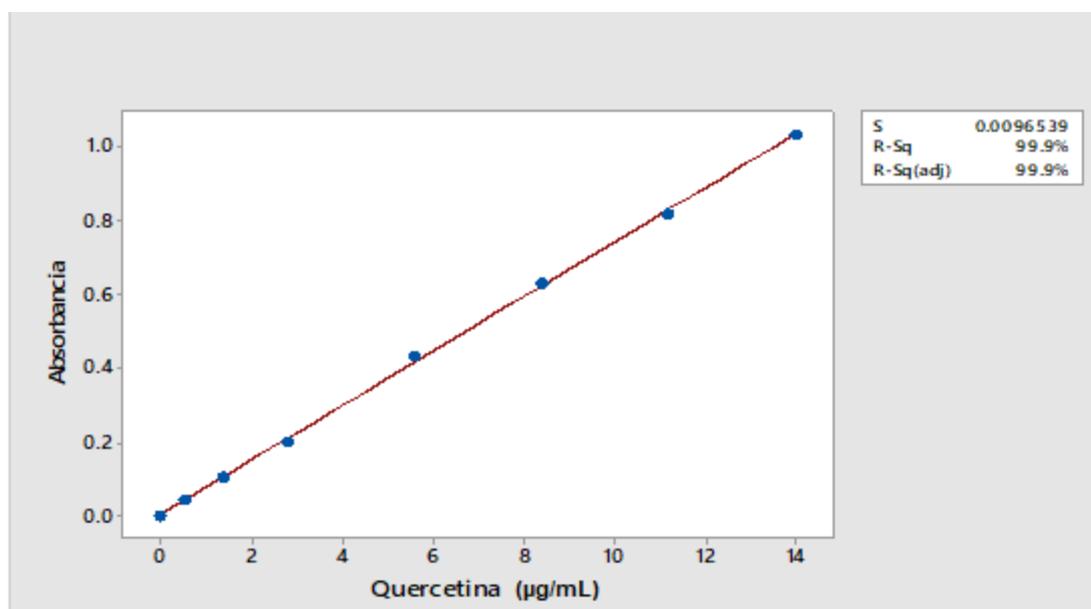
Muestras independientes por triplicado; media ± desviación estándar.

^{a, b, c y d}: Valores con letras diferentes en una misma columna expresan significancia para la prueba Tukey



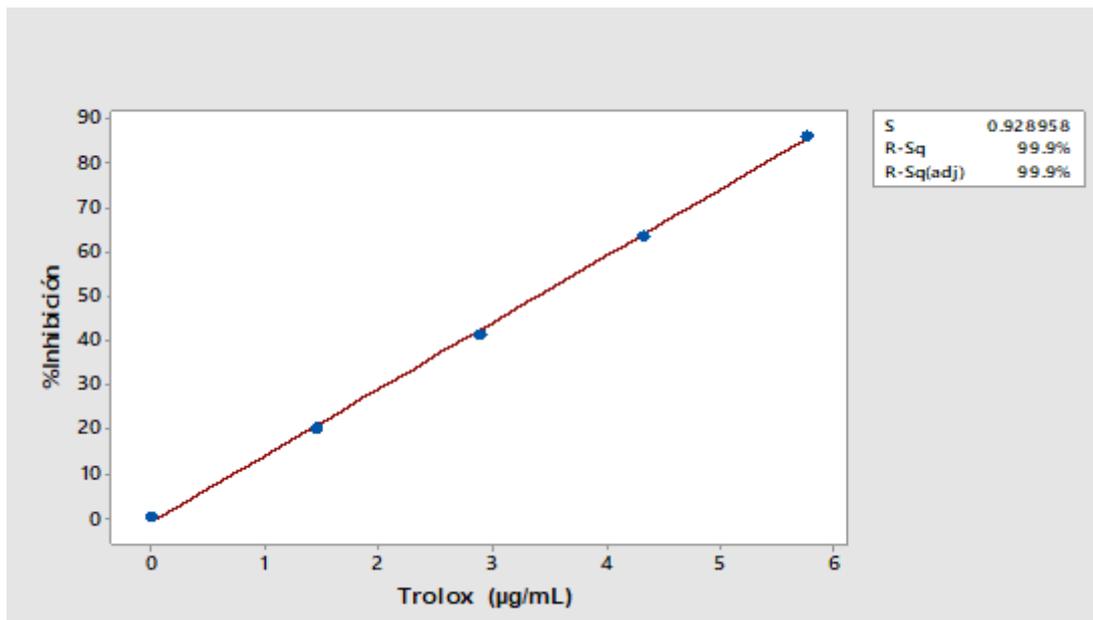
Anexo 5. Curva de calibración del ácido gálico

$$y=0,01553+0,09973x; R^2=99,9\%$$



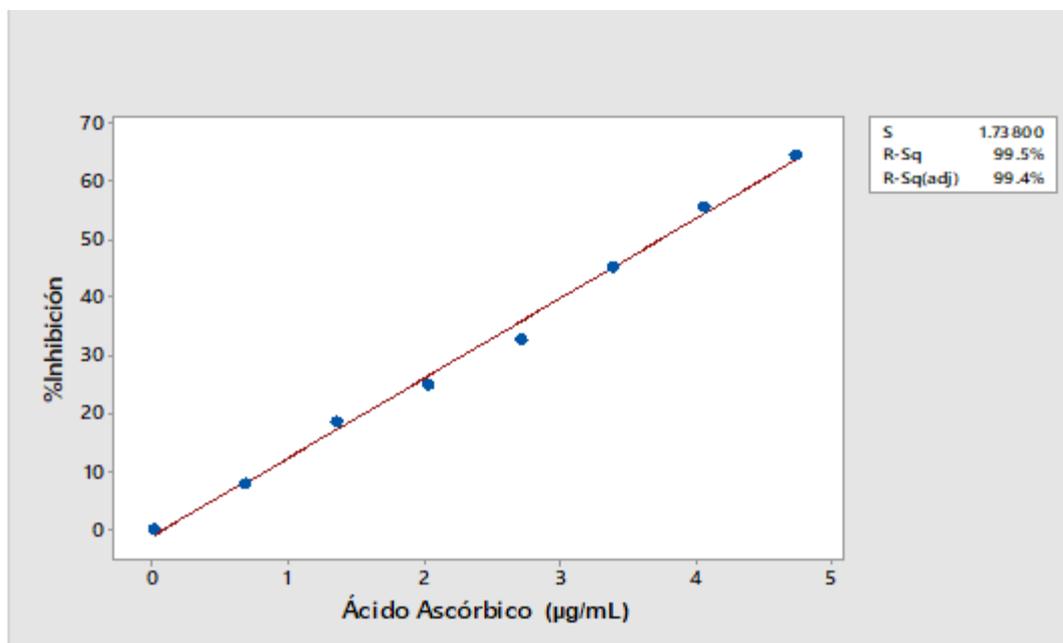
Anexo 6. Curva de calibración de quercetina

$$y=0,002938+0,07399x; R^2=99,9\%$$



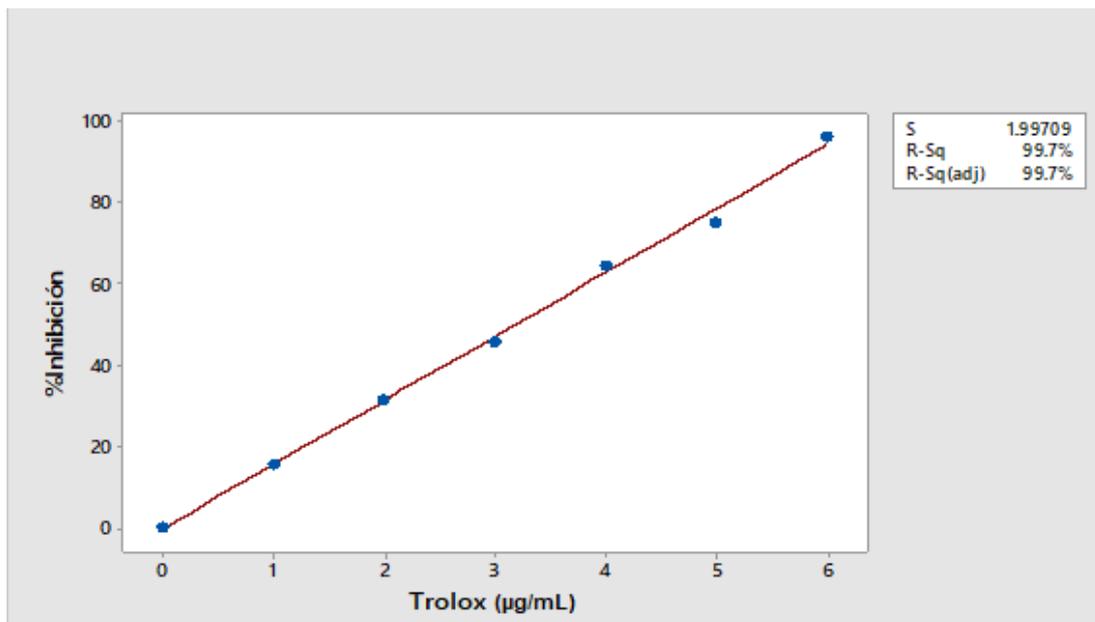
Anexo 7. Curva de calibración del trolox para el ensayo de DPPH.

$$y = -0,9000 + 15,00x; R^2 = 99,9\%$$



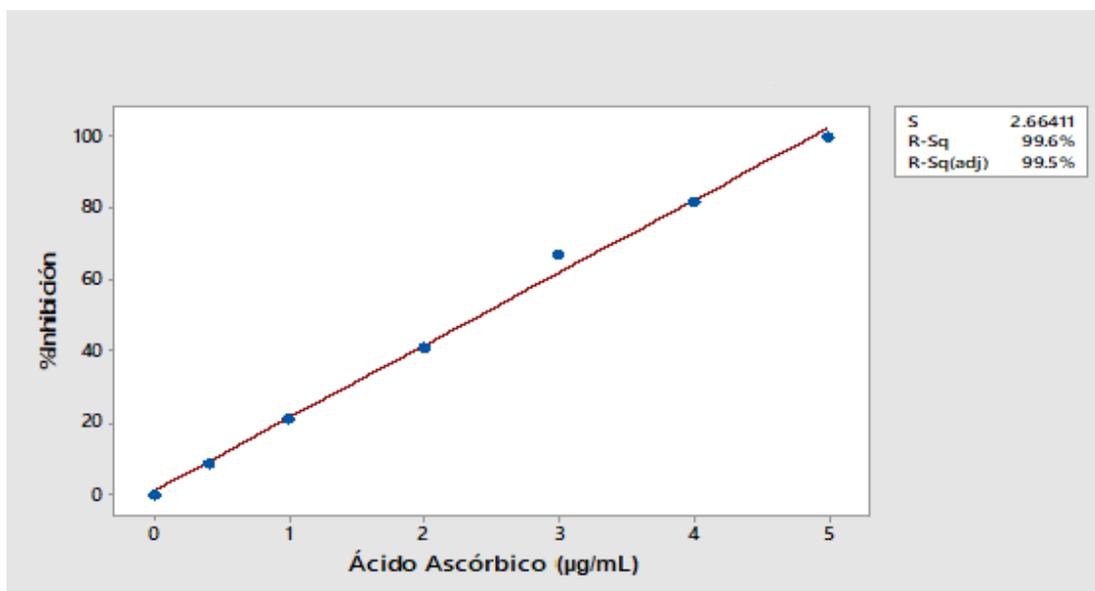
Anexo 8. Curva de calibración del ácido ascórbico para el ensayo DPPH

$$y = -1,209 + 13,68x; R^2 = 99,4\%$$



Anexo 9. Curva de calibración del trolox para el ensayo ABTS.

$$y = -0,306 + 15,79x; R^2 = 99,7\%$$



Anexo 10. Curva de calibración del ácido ascórbico para el ensayo ABTS.

$$y = 1,071 + 20,25x; R^2 = 99,5\%$$

Anexo 11. Coeficiente de correlación de Pearson (r) del extracto hidroalcohólico de la coronta de maíz morado.

Características	DPPH <i>IC50</i>	ABTS <i>IC50</i>
Cianidina-3-glucósido	-0,867	-0,893
Polifenoles	-0,948	-0,964
Flavonoides	-0,974	-0,985
Antocianinas	-0,999*	-1,000*
DPPH <i>IC50</i>	1	0,999*
ABTS <i>IC50</i>	0,999*	1

*La correlación de Pearson es significativa al nivel 0,05.

Anexo 12. Fotos

Foto 1. Maíz morado de Apurímac (Abancay).



Foto 2. Inducción de estrés con hierro/ácido ascórbico.



Foto 3. TBARS (adición de ácido tiobarbitúrico).

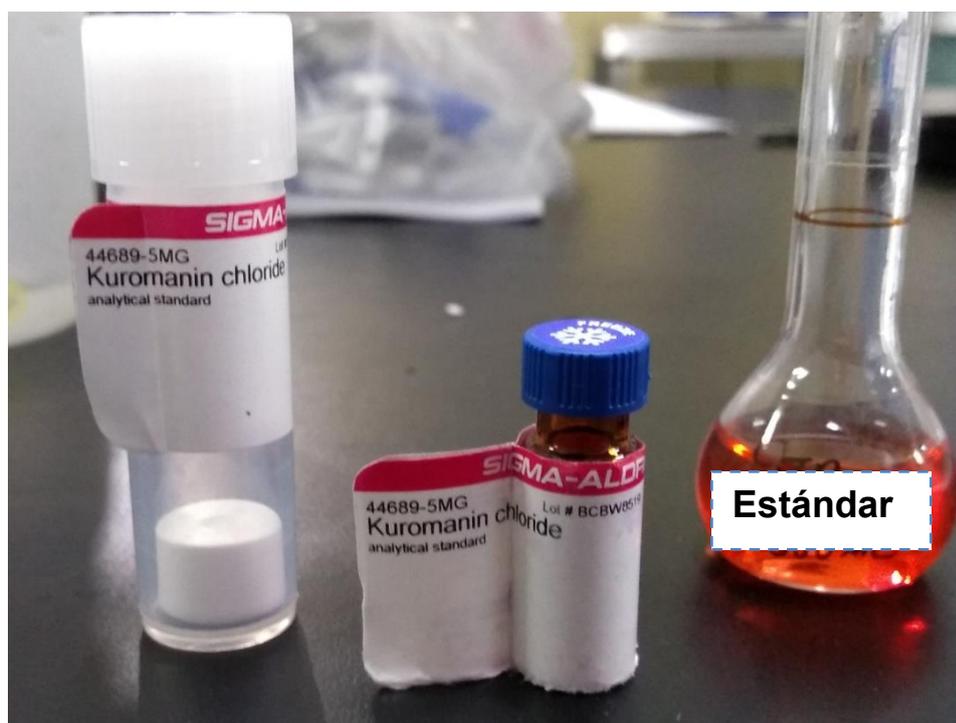


Foto 4. Preparación del estándar cianidina-3-glucósido.



Foto 5. Preparación de la muestra (filtro nylon 0,22 μ m).



Foto 6. Baño maría (extracto hidroalcohólico).