

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

## FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

### ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



#### TESIS I

“EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE *Lepidium meyenii*, “MACA ROJA”, SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA CON ACRILAMIDA EN MEMBRANA ERITROCITARIA DE *Rattus norvegicus var albinus*.”

#### AUTORES:

ACOSTA AVILA, ELVIS DAIGORO

BANCES GAYA, JOSE MANUEL

#### ASESOR:

Dr. Q.F. YBAÑEZ JULCA, ROBERTO

TRUJILLO – PERÚ

2014

## AGRADECIMIENTO

### *A Jehová Dios*

*Creador de todas las cosas, por habernos  
dado la vida y permitimos el haber llegado  
hasta este momento tan importante de  
nuestra formación profesional. Él supo  
guiarnos por el camino de la sabiduría,  
dándonos fuerzas para seguir adelante y no  
desmayar frente a las adversidades,  
enseñándonos a encararlas sin perder nunca  
la fe ni desfallecer en el intento, por ello, con  
toda la humildad que de nuestros corazones  
puede emanar, dedicamos primeramente este  
trabajo a Dios.*

*A los Señores: **Elder Acosta Viera y Teodocia Avila Vigo** mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.*

***Elvis Daígoro Acosta Ávila***

*A los Señores: **José Manuel Bances Mío y María Ligia de Bances**, mis queridos padres, quienes han estado a mi lado en las buenas y en las malas, han creído en mí y han dado un valor especial a mi vida. De quienes he recibido todo el amor que he requerido y han depositado en mí la semilla que me ha forjado hasta lo que soy. A los seres universalmente más amados dedico este esfuerzo que no solo ha sido mío, sino mucho de ello fue de ustedes.*

***José Manuel Bances Gaya***

*A los Profesionales: **Santiago León Florián, Germán Narro Cabezas, Luis Ruiz Gil**. Les damos las gracias por su comprensión, amabilidad y apoyo, por contribuir y ayudarnos a la realización del presente trabajo.*

***Los Autores.***

*Nuestro especial Agradecimiento al:*

***Dr. Roberto Ybañez***

***Júlca***

*Nuestro director de tesis quién  
con sus conocimientos y apoyo  
supo guiar el desarrollo de la  
presente tesis desde el inicio  
hasta su culminación.*

*Por la confianza que siempre ha  
tenido en nosotros, por haber  
guiado nuestro aprendizaje en el  
laboratorio, tanto a nivel  
asistencial como en el campo de  
la investigación, porque nos ha  
aconsejado y escuchado, a veces  
como maestro, a veces como  
amigo. Su insistencia y su  
entusiasmo han hecho posible  
esta tesis.*

***Los Autores***

## JURADO DICTAMINADOR

**Dra. Q.F. Elena Mantilla Rodríguez**

---

*Presidenta*

**Mg. Yuri Curo Vallejos**

---

*Miembro*

**Dr. Q.F. Roberto Ybañez Julca**

---

*Miembro*

## PRESENTACIÓN

*Señores miembros del Jurado Dictaminador:*

De conformidad con las Disposiciones Legales y vigentes del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a vuestro elevado criterio el presente informe intitulado:

**“EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE *Lepidium meyenii*,  
“MACA ROJA”, SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA CON  
ACRILAMIDA EN MEMBRANA ERITROCITARIA DE *Rattus norvegicus*  
var *albinus*.”**

Esperamos vuestra aprobación y dejamos a su criterio la calificación del presente informe.

Trujillo, Abril del 2014

*Los Autores.*

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó para determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii*, “maca roja”, en la lipoperoxidación inducida con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var. *albinus*. Se realizó una distribución aleatoria en los siguientes grupos: Blanco, Control I y II, Problema IA y IB y Problema IIA y IIB con 6 especímenes para cada grupo, respectivamente. Se les administró por un mes, extracto hidroalcohólico de la raíz de *Lepidium meyenii* a dosis de 1g/Kg/día para el Problema IA y IB y 2g/kg/día para el Problema IIA y IIB; mientras que el grupo Blanco solo recibió agua y comida *ad libitum*, así como el grupo Control I y II recibió placebo (NaCl 0.9%). Se indujo la lipoperoxidación, con 4mg/kg/día de acrilamida a todos los grupos a excepción del grupo Blanco. El día 14 después de la inducción con acrilamida se tomó la muestra de sangre por punción cardiaca a los especímenes de los grupos Control I, Problema IA y Problema IIA. Al completar el día 28 después de la inducción se tomó la muestra de sangre a los especímenes de los grupos restantes. Se determinó la lipoperoxidación según niveles de Malondialdehído (MDA) expresados en nmol/mL usando el método colorimétrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 532 nm de longitud de onda. Se concluye que la dosis de 2g/kg/día del extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii*, “Maca Roja” presenta mayor efecto antioxidante ( $p < 0.05$ )

**Palabras Claves:** lipoperoxidación, *Lepidium meyenii*, acrilamida, malondialdehído, ácido tiobarbitúrico

## ABSTRACT

The present investigation was conducted to determine the effect of hydroalcoholic extract of *Lepidium meyenii*, " Red Maca " on lipid peroxidation induced by acrylamide in erythrocyte membrane of *Rattus norvegicus var. albinus*. The random distribution was performed in the following groups: White, Control I and II, Problem IA and IB and Problem IIA and IIB with 6 specimens for each group, respectively. Hydroalcoholic root extract of *Lepidium meyenii* at doses 1g/Kg/día for Problem IA and IB and 2g/kg/día for Problem IIA and IIB was administered for one month, while the White group only received food and water *ad libitum*, and Control Group I and II received placebo ( 0.9 % NaCl ). Lipid peroxidation was induced with acrylamide 4mg/kg/día all groups except the White group. On day 14 after induction with acrylamide, was taken blood sample by cardiac puncture to the specimens of Control group I, Problem IA and IIA. By completing the 28<sup>th</sup> after induction was taken blood sample specimens of the other groups. Lipoperoxidation was determined as levels of malondialdehyde (MDA) expressed in nmol / mL using the colorimetric method of thiobarbituric acid (TBARS ) at 532 nm wavelength substances . We conclude that the dose of hydroalcoholic extract 2g/kg/día *Lepidium meyenii*, " Maca Red " has greater antioxidant effect ( $p < 0.05$ )

**Keywords:** lipoperoxidation, *Lepidium meyenii* acrylamide, malonaldehyde and Thiobarbituric Acid.



## ÍNDICE

|   | Pág.      |
|---|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>II. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2.1 MATERIAL .....</b>   | <b>9</b>  |
| 2.1.1. Material Biológico .....   | 18        |
| 2.1.2. Material de Laboratorio .....  | 18        |
| <b>2.2 METODOS Y TÉCNICAS .....</b>   | <b>11</b> |
| 2.2.1 Obtención de la especie vegetal .....   | 11        |
| 2.2.2 Preparación del Extracto Hidroalcohólico de <i>Lepidium meyenii</i> .....       | 11        |
| 2.2.3 Inducción de estrés oxidativo con acrilamida en membrana<br>eritrocitaria ..... | 12        |
| 2.2.4 Administración.....   | 12        |
| 2.2.5 Animales y Tratamiento .....  | 12        |
| 2.2.6 Realización de la Curva de Calibración .....                                    | 17        |
| 2.2.7 Análisis Estadístico .....  | 17        |
| <b>III. RESULTADOS .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>IV. DISCUSIÓN .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>V. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>ANEXOS</b>   |           |

## I. INTRODUCCIÓN

La Acrilamida (AA) o 2-propenamida es una amida de fórmula química  $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$  con número de identificación CAS 79-06-1, peso molecular 71,09 g/mol. Es soluble en agua, etanol, metanol, éter dimetílico y acetona e insoluble en heptano y benceno. Esta sustancia ha sido incluida en el Grupo 2A (sospechosa de ser carcinogénica para el ser humano) por la International Agency for Research on Cancer (IARC). Se utiliza en distintas aplicaciones industriales, entre otras, la elaboración de materiales plásticos. La poliacrilamida se utiliza en el tratamiento de aguas potables y de aguas residuales. También se utiliza para hacer adhesivos, papel y cosméticos. <sup>(1)</sup>

En el 2002, varios estudios realizados en Suecia pusieron de manifiesto la formación de acrilamida durante el tratamiento de ciertos tipos de alimentos sometidos a altas temperaturas, tanto en comidas elaboradas en establecimientos alimentarios como en hogares. <sup>(2)</sup> La AA es un producto intermedio de la secuencia de reacciones químicas que dan lugar al pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard (RM), como consecuencia de la reacción entre el aminoácido asparagina con los azúcares reductores (glucosa y fructosa). En concreto, el contenido en asparagina representa el 40 % del total de aminoácidos en la patata, lo que hace a esta matriz especialmente sensible. Estas reacciones tienen lugar cuando el alimento es sometido a temperaturas superiores a 120 ° C como ocurre en algunos procesos como la fritura u horneado. <sup>(3)</sup>

Asimismo, es un compuesto formado durante las RM con efectos neurotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos. Para que ocurra la RM es necesario que se cuente con dos reactantes principales; Un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) libre provenientes de aminoácidos (siendo más reactivos la lisina, arginina, histidina, triptófano y asparagina en menor proporción) o proteínas con grupo amino radical y un Grupo carbonilo de un azúcar reductor. Esta reacción se puede ver favorecida por las condiciones de la matriz del alimento o por el procesamiento, los cuales aceleran o disminuyen la formación de las melanoidinas y subproductos, siendo las condiciones

más importantes: pH alcalinos, temperaturas elevadas que aceleran la RM, sin embargo a temperaturas de refrigeración se puede dar dicha reacción, ya que la energía de activación ( $E_a$ ) es muy baja; la actividad de agua ( $a_w$ ) que favorece cuando se encuentra entre 0,6 y 0,9. A condiciones inferiores o superiores de este intervalo, se inhibe el mecanismo pues disminuye la movilidad de los reactantes a baja  $a_w$  o por efecto de dilución de los mismos a alta  $a_w$ .<sup>(4)(5)</sup>

Por otro lado, es una sustancia que al ser ingerida y metabolizada produce Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) debido a que la acción de la Citocromo P450 (CYP2E<sub>1</sub>) epoxida el enlace vinílico, dando un compuesto que se conoce como glicinamida de la cual se va a generar una gran cantidad de ROS. Además, este compuesto (glicinamida) puede establecer uniones covalentes con los grupos amino terminal de la hemoglobina e incluso iniciar la cascada de la peroxidación lipídica de las membranas. Como única vía de detoxificación, puede establecer una unión suicida al glutatión, que se elimina por la orina como ácido mercaptóúrico, mientras esta vía no se sature, y entonces provoca la apoptosis celular por la pérdida de la capacidad de la célula para contrarrestar la acción de metabolitos oxidantes.<sup>(6)</sup>

Entre los ROS se encuentra al radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y radical peroxilo. Estos causan daño oxidativo y se han visto implicado en la etiología o patología de más de cien enfermedades diferentes, entre las que se encuentran distintos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y vasculares, diabetes y desórdenes neurovegetativos.<sup>(7)</sup> Es conocido que estos pueden formarse in vitro e in vivo por medio de reacciones espontáneas llamadas de Haber-Weis o tipo Fenton en donde interviene como catalizador un metal de transición, siendo el más importante el hierro.<sup>(8)(9)(10)</sup>

Los sistemas biológicos poseen varios mecanismos productores de estas especies reactivas. Dentro de los sistemas endógenos, uno de los mecanismos más importantes de producción de radicales libres es la cadena de transporte mitocondrial, concretamente en la denominada reducción monovalente o incompleta del  $O_2$  -que representa un 3-5% del total- en la que éste va cogiendo electrones de forma secuencial, y se van generando especies reactivas. Entre los

mecanismos procedentes de sistemas exógenos que producen radicales libres se encuentran, entre otros, la biotransformación de drogas y xenobióticos, las radiaciones ionizantes de alta energía, la radiación solar, el humo de tabaco y el choque térmico. <sup>(11)</sup>

Para proteger contra las acciones perjudiciales de los ROS, el cuerpo humano contiene una red de antioxidantes. El término antioxidante se ha definido como "cualquier sustancia que cuando esté presente a concentraciones bajas, comparadas con aquellos sustratos oxidables, retrasa significativamente o previene la oxidación de ese sustrato." <sup>(12)</sup>

Los mecanismos de defensa frente a los radicales libres se pueden clasificar en función de su naturaleza catalítica en enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo, los enzimáticos, se encuentran fermentos que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres, entre los que se encuentran: Superóxido dismutasa (SOD), que transforma el oxígeno en peróxido de hidrógeno. La Catalasa (CA) puede degradar el peróxido de hidrógeno. Glutación peroxidasa (GPX), que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres. Proteínas de unión a metales (GR), que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical OH. <sup>(6)</sup> Las proteínas como la transferrina, ferritina, y ceruloplasmina previenen la formación de radicales hidroxilo separando los metales de transición. En el segundo grupo de antioxidantes, los secundarios no enzimáticos hay 2 subgrupos: Antioxidantes hidrofílicos: entre los que se encuentran la glutación, vitamina C, (ascorbato), ácido úrico, bilirrubina, albúmina y flavonoides. Antioxidantes lipofílicos: entre los que se encuentran la vitamina E (alfatocoferol), carotenoides y las ubiquinonas. <sup>(13)(6)</sup>

La sangre contiene aproximadamente  $4-5 \times 10^9$  eritrocitos/mL, representando aproximadamente el 96% de todas las células de la sangre, cuya principal función es de proporcionar oxígeno a toda las células de organismo. <sup>(14)</sup> Cada eritrocito contiene aproximadamente  $3 \times 10^8$  moléculas de Hemoglobina (Hb). Esta altísima concentración intracelular le permite cumplir con la

función esencial del transporte de gases desde y hacia los pulmones además de ser la responsable del color rojo característico de la sangre. <sup>(15)</sup>

La proteína espectrina, que recibe ese nombre porque se descubrió en eritrocitos fantasmas, la cual es el 75% del esqueleto de la membrana del eritrocito. Compuesta por dos cadenas polipeptídicas similares, una subunidad de 280 kDa y otra de 246 kDa, cada una de las cuales está constituida por segmentos repetitivos de 106 residuos que se pliegan en espirales enrollados helicoidales de tres hebras. <sup>(16)</sup> También se asocia con una proteína de 1880 residuos conocida como anquirina, que se une a una proteína integral de membrana que constituye un canal iónico, conocido como Banda 3. Esta unión ancla el esqueleto a la membrana. La actina también está formando parte de este esqueleto, al igual que las proteínas 4.1R, dematina, tropomiosina y tropomodulina. <sup>(17)</sup>

La membrana eritrocitaria es una estructura compuesta por lípidos en los cuales se ancla en dos dimensiones una malla elástica de proteínas que forman el esqueleto al que se suman proteína transmembrana que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica. Existen más de 50 proteínas transmembrana con variada abundancia desde cientos a millones de copias por eritrocito. Alguna fracción de estas proteínas definen los diversos grupos sanguíneos. Las proteínas de membrana exhiben heterogeneidad de funciones, actuando como proteínas de transporte, como proteínas de adhesión implicadas en la interacción de los eritrocitos entre ellos así como también con las células endoteliales, asimismo actúan como receptores de señales y un gran grupo aún con funciones desconocidas. <sup>(18)</sup>

En lo que respecta a los lípidos de la membrana de los eritrocitos, estos se componen de manera proporcional entre el colesterol y los fosfolípidos. <sup>(17)</sup> Fosfatidilcolina y esfingomielina están predominantemente localizadas en la monocapa exterior, mientras que gran parte de la fosfatidiletanolamina y toda la fosfatidilserina (PS), junto con el fosfoinositol minoritario constituye la capa interna de la membrana. <sup>(19)</sup> Los eritrocitos al ser lisados y sus membranas aisladas, generan unas partículas membranosas que se conocen como eritrocitos fantasmas

porque, al volver a las condiciones fisiológicas, se sellan nuevamente para formar partículas incoloras que retienen su forma original pero que están desprovistas de citoplasma. <sup>(20)</sup>

El tratamiento fitoterapéutico, viene cobrando día a día impacto significativo en la recuperación de la salud. El uso de las plantas medicinales data desde los albores de la humanidad. En el área andina se cultivan muchas plantas, como la milenaria “maca”.

*Lepidium meyenii* (maca), es un producto que se cultiva en los andes desde el tiempo de los incas en altitudes comprendidas entre 3 800 a 4 500 msnm. Esta planta alto andina, es uno de los pocos recursos con que cuentan los habitantes en las grandes alturas de la sierra del Perú. <sup>(21)</sup> La zona donde esta especie se encuentra es una región de condiciones climáticas extremas, como la congelación, feroces vientos y la luz solar intensa. Los herbolarios han reconocido desde hace tiempo, que las plantas resistentes son especialmente valiosas desde la perspectiva de medicamento cuando se consume. <sup>(22)</sup>

Esta raíz tiene diversos efectos en el organismo, habiéndose estudiado y encontrado una alta capacidad antioxidante de la maca roja, y se asume que se deba al contenido de fenoles y flavonoides, y puede ser considerada como fuente importante de antioxidantes naturales, que podrían contrarrestar el exceso de radicales libres que perjudiquen la salud. <sup>(23)</sup>

La mayor parte de autores describen diferentes ecotipos de Maca, teniendo en cuenta el color externo de la raíz, las que presentan principalmente colores; amarillo 47.8%, negro 4.2%, rojo-blanco 16.5%, rojo amarillo 3.7%, blanco 2.2% y morado 9%; existen sin embargo sub-categorías descritas que también han sido observados en trabajos de campo realizados en diferentes localidades de los departamentos de Junín y Pasco durante los últimos años. <sup>(23)</sup>

El tubérculo del *Lepidium meyenii* (maca) contiene gran cantidad de vitaminas, es así que se encuentra presente la vitamina E y vitamina C en gran cantidad, también se encuentra vitaminas del complejo B. La presencia de minerales hace que la maca sea un excelente revitalizante. Entre los minerales tenemos al potasio y sodio; también minerales que son cofactores enzimáticos importantes para el organismo, como son el cobre, magnesio y zinc. Además

contiene el derivado benzilado de 1.2-Dihidro-N-hidroxipiridina, llamada macaridina junto con el alcaloide benzilado macamida: N-Benzil-5-oxo-6E, 8E-octadecadienamida y N-Benzilhexadecanamida, glucosinolatos p-metoxibencil, esteroides y/o triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides y/o cumarinas, taninos, glucósidos, saponinas, amina alifática secundaria, aminas terciarias, almidón, fructosa, ácidos grasos y aceites naturales. <sup>(24)</sup>

Los glucosinolatos, principal metabolito secundario, por sí solo no tiene actividad biológica pero transformada en isotiocianatos o en metabolitos de estos últimos adquiere importante actividad biológica principalmente pro-apoptótica y antiproliferativa. La enzima mirosinasa la cual es activada en los tejidos de plantas dañadas y que también se encuentra presente en la microflora del tracto digestivo de los humanos convierte los glucosinolatos aun número de compuestos entre los que se encuentran los isotiocianatos. Los isotiocianatos descritos son el bencilisotiocianato y el m-metoxibencil isotiocianato, p-metoxibencil isotiocianato. Los principales glucosinolatos encontrados en las hojas de la maca, son los glucosinolatos aromáticos uno de los cuales el más importante es el bencilglucosinolato.

En tal sentido, siendo la acrilamida, sustancia altamente oxidante presente en alimentos preparados a temperaturas mayores de 120 ° C (parrillas, horneados, asados, etc.) los cuales su consumo ha ido en aumento en nuestra población, ya sea en niños, jóvenes y adultos. Por ello vemos la necesidad de buscar alternativas para contrarrestar los daños que ésta clase de alimentos conlleva, entre los cuales uno de ellos es el estrés oxidativo. Con el interés de ampliar el conocimiento de esta especie nativa peruana, el presente trabajo pretende demostrar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Lepidium meyenii*, sobre la lipoperoxidación inducida con acrilamida en membrana eritrocitaria, con el fin de fomentar su uso por parte de la población, disminuyendo así la probabilidad de adquirir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como: enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes, hipercolesterolemia. etc.

Por lo que en el presente trabajo se plantea el siguiente problema:

¿Cuál es el efecto del extracto hidroalcohólico de *lepidium meyenii*, “maca roja”, sobre la lipoperoxidación inducida con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var. *albinus*?

## 1. HIPÓTESIS:

El extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii* “Maca Roja” tiene efecto antioxidante, traducidos en disminución de los niveles de malondialdehído, sobre el estrés oxidativo inducido con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1 Objetivo general:

- ✓ Determinar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii*, “Maca Roja”, sobre el estrés oxidativo inducido con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

### 2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Determinar los niveles de malondialdehído el día 14 y 28 de la inducción del estrés oxidativo con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var *albinus*.
- ✓ Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii* en dosis de 1 y 2g /kg sobre lipoperoxidación inducida expresada en niveles de malondialdehído en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var *albinus*.
- ✓ Comparar el efecto de las dosis de 1 y 2g/ kg del extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii* sobre lipoperoxidación inducida expresada en niveles de malondialdehído en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var *albinus*.



## II. MATERIAL Y MÉTODO

### 2.1 MATERIALES:

#### 2.1.1 Material Biológico:

##### 2.1.1.1 Especie Vegetal:

- Se emplearon las raíces pulverizadas y liofilizadas de *Lepidium meyenii* (maca roja) obtenidas del Centro de Ventas “CAYENATUR” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Lima. Con las siguientes especificaciones: Lote N° 201011, 3g por sobre y fecha de Vencimiento: octubre de 2014.

##### 2.1.1.2 Animales de Experimentación:

- Se empleó 42 especímenes de *Rattus norvegicus* var. *albinus*, hembras pre-púberes con una edad promedio de 60 días, con pesos que oscilan entre 180 y 200 g en aparente buen estado de salud, adquiridas del bioterio del Instituto Nacional de Salud – Lima.

#### 2.1.2 Material de Laboratorio:

##### 2.1.2.1 Reactivos:

- Acrilamida  
Laboratorio: MERCK
- Tampón fosfatos 50 mM pH 7
- Tampón de fosfatos 5mM de pH 8
- Ácido Acético 5% v/v
- Ácido Tiobarbitúrico 0.8% p/v
- N-butanol-piridina (10:1 V/V)
- Ketamina
- Cloruro de Potasio 2% p/v
- Cloruro de Sodio 0.9%

- Agua Destilada

#### **2.1.2.2 Material de Vidrio:**

- Pipetas 1mL, 5mL y 10 ml Fortuna
- Micropipetas 100 ul. y puntas
- Tubos eppendorf 1.5ml.
- Fiolas 50 ml, 100mL y 500 ml.
- Tubos de ensayo Kimax
- Vasos de precipitación de 50 ml, 100 ml, 250 ml y 1000 ml Kimax
- Matraces de 100 y 250 ml Kimax
- Probetas 100 ml.
- Varillas de vidrio
- Embudo de vidrio
- Frascos de vidrio

#### **2.1.2.3 Equipos:**

- pHmetro – “Metter Toledo”
- Balanza analítica – “Meter Toledo”.
- Espectrofotómetro – “Genesys 10uV. Thermoelectron”
- Cocina eléctrica – “Colvex”
- Centrifuga refrigerada Universal 320 “Hettich centrifuguen”.
- Refrigeradora “Coldex”
- Equipo para baño maria “Memmert”
- Equipo de Disección
- Cámara de Flujo Laminar (Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas).

#### **2.1.2.4 Otros:**

- Sondas nasogástricas N° 4
- Tubos con anticoagulante EDTA

- Gradillas
- Picéta
- Bolsas de hielo.
- Guantes.
- Mascarilla
- Jeringa de tuberculina, 5cc, 10 cc y 20cc
- Jaulas metálicas
- Tijeras y bisturí
- Calculadora CASIO

## 2.2 MÉTODOS Y TÉCNICAS:

### 2.2.1 Obtención de la especie vegetal:

Las raíces de *Lepidium meyenii* (maca roja) se obtuvieron como extractos liofilizados, concentrados en presentación de sachets de 3g; adquiridas en un buen estado de conservación, calidad y forma del Centro de Ventas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Lima.

### 2.2.2 Preparación del Extracto Hidroalcohólico de *Lepidium meyenii* (maca roja):

Se obtuvieron los hipocólitos de *Lepidium meyenii* (maca roja) de Carhuamayo, Junín a 4000 metros de altitud, identificados por los Investigadores Botánicos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los hipocólitos fueron secados y pulverizados. Para obtener el extracto etanólico se usó el método de Soxhlet, colocando en el balón alcohol de 96° y se sometió a extracción. El producto se deja en reposo para enfriar y luego se liofiliza. El liofilizado de maca roja es envasado en sachets y expandido por “CAYENATUR”. El extracto alcohólico que se obtiene de este proceso posteriormente es diluido en agua para la administración de los especímenes, transformándose en un extracto hidroalcohólico.

### **2.2.2.1 Dosificación:**

La dosis administrada de maca fue de 1g/Kg/p.c/día para el grupo Problema IA y IB y 2g/Kg/p.c/día para el grupo Problema IIA y IIB. El liofilizado de *Lepidium meyenii* (maca roja) obtenidas de “CAYENATUR” fueron disueltas en 600 ml de agua bidestilada a una concentración de 0.15g/ml (dosis de 1g/kg) y 0.45g/ml (dosis de 2g/kg), se colocó en frascos ámbar para su posterior uso durante un mes.

### **2.2.3 Inducción de estrés oxidativo con acrilamida en membrana eritrocitaria**

Se basó en la administración por vía oral de acrilamida en dosis de 4mg/kg/p.c/día, para el grupo Control I y II, Problema IA y IB y Problema IIA y IIB. La acrilamida se diluyó en 1120ml de agua bidestilada a una concentración de 0.86mg AA/ml, se colocó en un frasco ámbar y se agitó con una varilla de vidrio para su posterior uso durante 28 días. Todo el procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar proporcionada por la Facultad de Ciencias Biológicas.

### **2.2.4 Administración:**

La administración de *Lepidium meyenii*, maca roja, y de acrilamida fue por vía oral, para ello se utilizó sonda alimentaria N° 4.

### **2.2.5 Animales y Tratamiento:**

#### **2.2.5.1 Preparación de los especímenes:**

Los especímenes seleccionados fueron colocados en jaulas metálicas, en condiciones de laboratorio sometidas a las mismas características ambientales de temperatura, e iluminación. Se mantuvo con acceso a comida (purina) y agua *ad libitum* durante un periodo necesario de adaptación. En estas condiciones se distribuyó los grupos de estudio. Al término de los tratamientos se anestesió los animales para obtener muestras de sangre.

### 2.2.5.2 Distribución de los especímenes:

Los animales fueron distribuidos en 7 grupos:

#### **GRUPO BLANCO**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les mantuvo con comida y agua *ad libitum* por vía oral durante dos meses, al término de este tiempo fueron anestesiados con dosis de ketamina 100 mg/kg para la extracción de sangre por punción cardiaca. Y los resultados obtenidos serán considerados para los días 14 y 28.

#### **GRUPO CONTROL I**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les administró por vía oral suero salino (0.9%) 1mL/kg de peso durante un mes, luego se indujo el estrés oxidativo con acrilamida 4 mg/ kg de peso corporal/ día en 1.5 ml de agua por vía oral durante 14 días. El día 14 después de la inducción con AA se le extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca a los especímenes para su posterior análisis.

#### **GRUPO CONTROL II**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les administro por vía oral suero salino (0.9%) 1mL/kg de peso durante un mes, luego se indujo el estrés oxidativo con acrilamida 4 mg/ kg de peso corporal/ día en 1.5 ml de agua por vía oral durante 28 días. El día 28 después de la inducción con AA se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca para su posterior análisis.

#### **GRUPO PROBLEMA IA**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les administrò por vía oral 1g//Kg/día de *Lepidium meyenii* diluido, durante un mes, luego se indujo el estrés oxidativo con acrilamida 4 mg/ kg de peso corporal/ día en 1.5 ml de agua por vía oral durante 28 días. El día 14 después de la inducción con AA

se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca a la mitad de los especímenes para su posterior análisis.

#### **GRUPO PROBLEMA IB**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les administro por vía oral 1g//Kg/día de *Lepidium meyenii* diluido, durante un mes, luego se indujo el estrés oxidativo con acrilamida 4 mg/ kg de peso corporal/ día en 1.5 ml de agua por vía oral durante 28 días. El día 28 después de la inducción con AA se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca a la mitad de los especímenes para su posterior análisis

#### **GRUPO PROBLEMA IIA**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les administró por vía oral 2g / Kg/día de *Lepidium meyenii* diluido, durante un mes, luego se indujo el estrés oxidativo con acrilamida 4 mg/ kg de peso corporal/ día en 1.5 ml de agua por vía oral durante 28 días. El día 14 después de la inducción con AA se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca a la mitad de los especímenes para su posterior análisis

#### **GRUPO PROBLEMA IIB**

Constituido por 6 especímenes a los cuales se les administró por vía oral 2g / Kg/día de *Lepidium meyenii* diluido, durante un mes, luego se indujo el estrés oxidativo con acrilamida 4 mg/ kg de peso corporal/ día en 1.5 ml de agua por vía oral durante 28 días. El día 28 después de la inducción con AA se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca a la mitad de los especímenes para su posterior análisis

#### **2.2.5.3 Extracción de las muestras:**

Al término de los tratamientos, se obtuvo sangre por punción cardiaca (3ml) y se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA.

#### **2.2.5.4 Obtención de los Eritrocitos**<sup>(26)</sup>

Los tubos con EDTA que contenían la sangre se centrifugó a 2,000 revoluciones por minuto (rpm) por 12 minutos; al término de esto, se separó el paquete globular (eritrocitos) del plasma y del concentrado de leucocitos. Una vez obtenido el paquete globular, fue almacenado y mantenido en refrigeración (1-6 °C).

La muestra de eritrocitos fue colocada en un tubo de vidrio y centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. A los eritrocitos que se encontraron en el precipitado se le agregó 3 ml de solución salina con amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7) fría. Los eritrocitos fueron centrifugados nuevamente bajo las condiciones ya descritas y lavados dos veces más con la solución salina.

#### **2.2.5.5 Obtención de Membrana Celular de los Eritrocitos**<sup>(26)</sup>

Los eritrocitos fueron lisados, usando 5 volúmenes un amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8: 5mM de buffer de fosfatos pH 8) con agitación moderada, dejándose reposar por 15 min a 4°C. Los eritrocitos lisados fueron centrifugados a 10, 000 rpm por 15 minutos. El precipitado es la fracción membranal. La fracción membranal fue lavada dos veces más con 5P8 y resuspendida en solución salina isotónico (NaCl 0.9%) hasta posterior uso.

#### **2.2.5.6 Determinación de la lipoperoxidación en membranas de células eritrocitarias por la técnica del ácido Tiobarbitúrico**

##### ***Fundamento***

La capacidad de peroxidación lipídica de las membranas celulares se determina a través de la cuantificación de los productos de reacción con el

ácido tiobarbitúrico (TBARS) cuyo principal representante es el malondialdehído (MDA). El malondialdehído (MDA) es un producto derivado del metabolismo del ácido araquidónico, que se produce por hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH<sub>2</sub> junto al ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico.<sup>(25)</sup>

La determinación de este metabolito del ácido araquidónico nos indica de modo indirecto los niveles de peroxidación alcanzados por un tejido (*Buege y Aust, 1978*) y, aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, sí es un buen indicador del funcionalismo de esta vía oxidativa. Presenta también la ventaja de que puede colorearse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico; lo que nos permite de forma fácil cuantificar sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica. (*Bird y Draper, 1984*).<sup>(25)</sup>

#### **Método**<sup>(26)</sup>

Se tomó una muestra de membrana de eritrocitos se colocó en un tubo de ensayo junto con 1ml de amortiguador PBS pH 7 e incubado a 37°C por 30 minutos. Al término de la incubación, se agregó 1.5ml de Ácido Acético (5% v/v) y 1.5 ml de Ac. Tiobarbitúrico (0.8% p/v). Las muestras fueron incubadas por 60 minutos a 90°C. Después se enfriaron y se agregó 1 ml de KCl (2% p/v) y 3 ml de una mezcla de Butanol/Piridina (1: 10 v/v). La mezcla así obtenida se agitó y centrifugó durante 10 minutos a 3,000 rpm. Al termino de esto se recuperó la fase de Butanol /Piridina la cual se leyó a 532 nm en el espectrofotómetro. La concentración de MDA fue expresada en nmol/ml.



### **2.2.6 Realización de la Curva de Calibración de MDA**

La curva de calibración se realizó con el método de estándar externo con 1,1,3,3-tetraetoxipropano de serie (malondialdehído) , obteniéndose el gráfico y usando la ecuación resultante para los cálculos de malondialdehído en nmol/ml.

### **2.2.7 Análisis Estadístico de los Resultados:**

Los resultados obtenidos de los niveles de MDA fueron analizados empleando el Análisis de varianza (ANOVA), para determinar la significancia estadística considerando una  $p < 0.05$  y posteriormente se realizó la Prueba de Duncan que permite la comparación de grupos para determinar si el efecto es real.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIQUIMICA

### III.RESULTADOS

***CUADRO N° 01: Niveles de Malondialdehido (nmol/mL) post inducción de 14 días con acrilamida en membrana eritrocitaria de Rattus norvegicus var albinus, Grupos: Blanco, Control I, Problema IA y Problema IIA.***

#### PRUEBA DE ANOVA

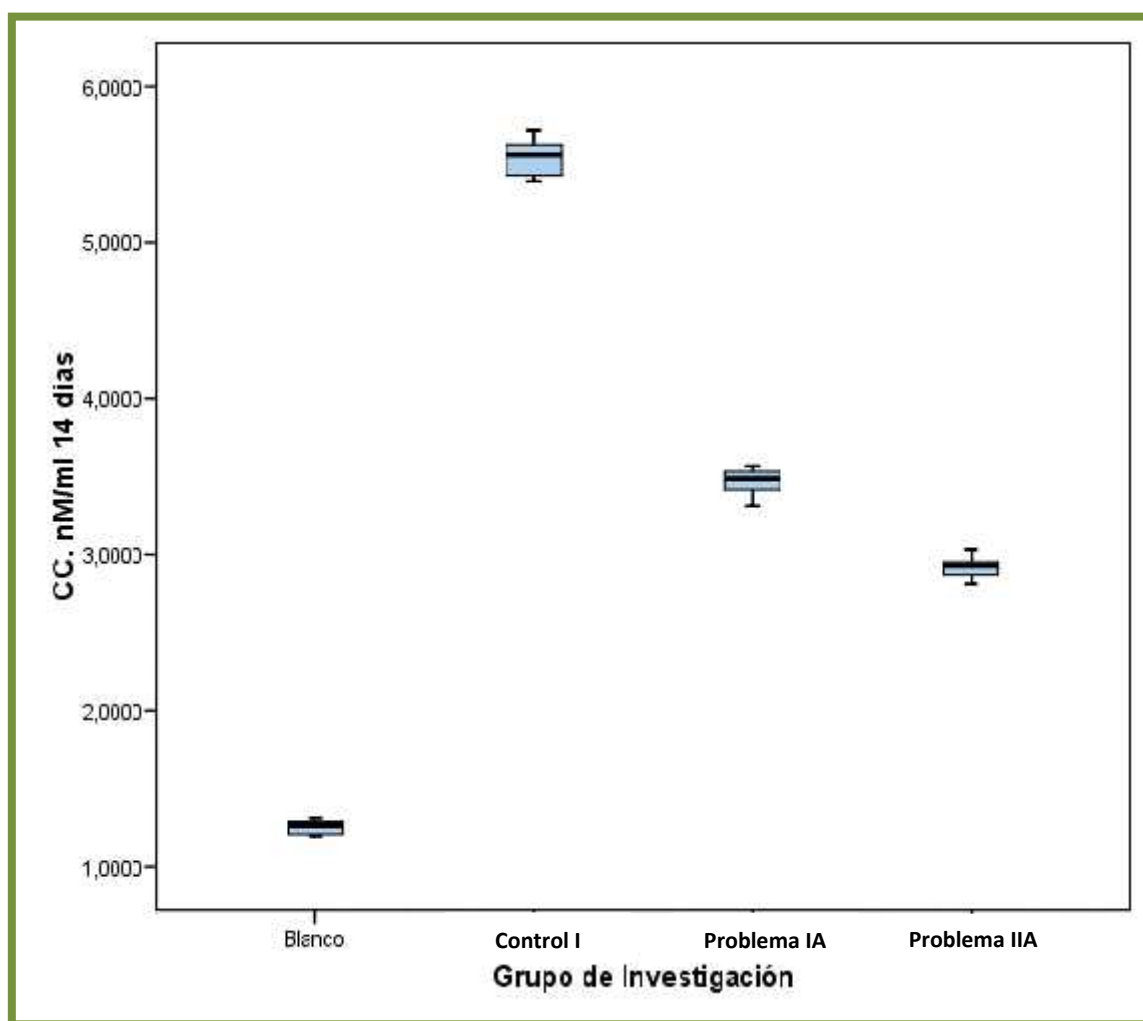
| Fuente de Variación | SC     | GL | CM     | Fo        | P     |
|---------------------|--------|----|--------|-----------|-------|
| Tratamiento         | 56.436 | 3  | 18.812 | 2,376.267 | 0.000 |
| Error               | 0.158  | 20 | 0.008  |           |       |
| Total               | 56.595 | 23 |        |           |       |

#### PRUEBA DE DUNCAN

| Grupo de Investigación | n | Grupos para Alfa 0.05 |      |      |      |
|------------------------|---|-----------------------|------|------|------|
|                        |   | G1                    | G2   | G3   | G4   |
| Blanco                 | 6 | 1.26                  |      |      |      |
| Problema IIA           | 6 |                       | 2.92 |      |      |
| Problema IA            | 6 |                       |      | 3.47 |      |
| Control I              | 6 |                       |      |      | 5.55 |

#### Leyenda:

- $P < 0.05$  Significativo,  $P < 0.01$  Muy Significativo,  $P < 0.001$  Altamente significativo
- **Grupo Blanco:** agua y comida.
- **Grupo Control I:** AA 4mg/kg/día.
- **Problema IA:** 1g/kg/día de maca roja + AA 4mg/kg/día.
- **Problema IIA:** 2g/kg/día de maca roja + AA 4mg/kg/día.
- **n:** número de *Rattus norvegicus var. albinus*.



**FIGURA 01:** Niveles de Malondialdehído (nmol/mL) post inducción de 14 días con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus var albinus*, Grupos: Blanco, Control I, Problema IA y Problema IIA.

***Cuadro 02: Niveles de Malondialdehído (nmol/mL) post inducción de 28 días con acrilamida en membrana eritrocitarias de Rattus norvegicus var albinus, Grupos: Blanco, Control II, Problema IB y Problema IIB.***

## PRUEBA DE ANOVA

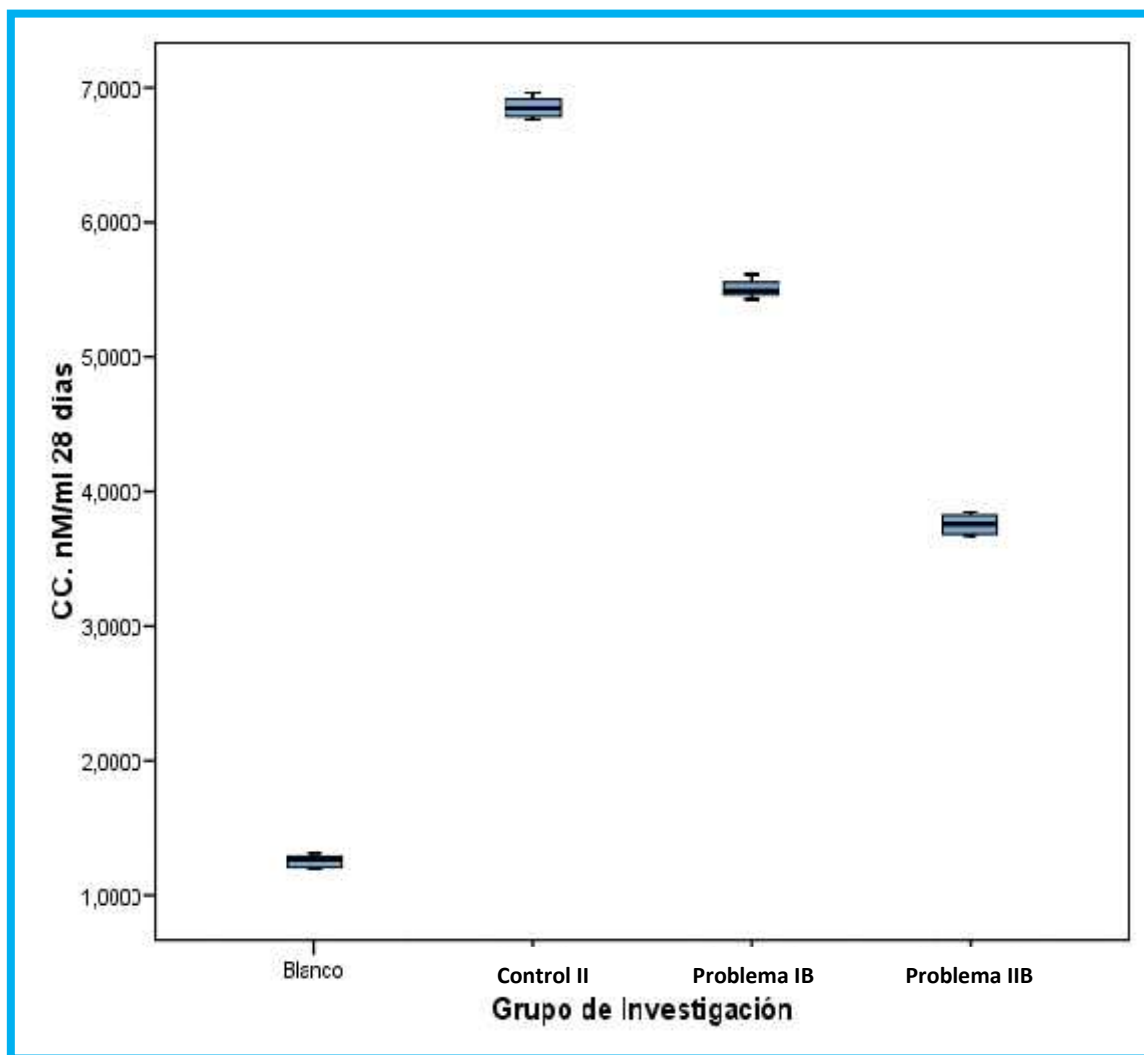
| Fuente de Variación | SC      | GL | CM     | Fo        | P     |
|---------------------|---------|----|--------|-----------|-------|
| Tratamiento         | 105.230 | 3  | 35.077 | 7,855.506 | 0.000 |
| Error               | 0.089   | 20 | 0.004  |           |       |
| Total               | 105.319 | 23 |        |           |       |

## PRUEBA DE DUNCAN

| Grupo de Investigación | n | Grupos para Alfa 0.05 |      |      |      |
|------------------------|---|-----------------------|------|------|------|
|                        |   | G1                    | G2   | G3   | G4   |
| Blanco                 | 6 | 1.26                  |      |      |      |
| Problema IIB           | 6 |                       | 3.76 |      |      |
| Problema Ib            | 6 |                       |      | 5.51 |      |
| Control II             | 6 |                       |      |      | 6.85 |

**Leyenda:**

- $P < 0.05$  Significativo,  $P < 0.01$  Muy Significativo,  $P < 0.001$  Altamente significativo
- **Grupo Blanco:** agua y comida.
- **Grupo Control I I:** AA 4mg/kg/día.
- **Problema IB:** 1g/kg/día de maca roja + AA 4mg/kg/día.
- **Problema IIB:** 2g/kg/día de maca roja + AA 4mg/kg/día.
- **n:** número de *Rattus norvegicus var. albinus*.



**FIGURA 02:** Niveles de Malondialdehído (nmol/mL) post inducción de 28 días con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus var albinus*, Grupos: Blanco, Control II, Problema IB y Problema IIB.

#### IV. DISCUSIÓN

En situaciones de estrés, el equilibrio entre antioxidantes y oxidantes se altera; los últimos son los que prevalecen. Este fenómeno genera diferentes grados de citotoxicidad que lesiona al ADN, a las proteínas, a los lípidos y a los carbohidratos. Si la severidad del estrés oxidativo es muy grande, todas las estructuras celulares importantes, las macromoléculas y las vías metabólicas se oxidan, se lesionan y posteriormente son bloqueadas o inhibidas, dando lugar a la muerte celular por necrosis. <sup>(27)</sup>

En la presente investigación, se tuvieron en cuenta parámetros de uniformidad entre los especímenes, realizando la prueba de homogeneidad respecto al peso corporal de todos los ejemplares, aleatorizándose en grupos; Blanco, Control I, Control II, Problema Ia, Problema IIa, Problema IIa y Problema II b, teniendo cierta variación de los pesos de cada espécimen (180 a 200g).

El cuadro N° 01, muestra los niveles de MDA (nmol/mL) post inducción de 14 días con acrilamida en membrana eritrocitaria de *Rattus norvegicus* var. *albinus*. Para ello se realizó la prueba de ANOVA donde se observa un  $P < 0.001$  (0.000) lo cual demuestra una alta significancia estadística; indicando que son comparables cada grupo investigado. Para determinar diferencias significativas entre grupos se realizó la prueba de Duncan, la cual determina en 4 subgrupos diferentes; en el subgrupo 1 está incluido el grupo Blanco, en el subgrupo 2 está incluido el grupo Problema IIa, que por el resultado obtenido (2.92 nmol/mL de MDA) se acerca mucho al grupo blanco (1.26 nmol/mL de MDA), lo cual significa que la dosis utilizada de maca (2g/kg/día) disminuye significativamente los niveles de MDA, previniendo la lipoperoxidación de células eritrocitaria hasta niveles casi basales. En el subgrupo 3 encontramos al grupo Problema Ia y en el subgrupo 4 se encuentra el grupo Control I, los cuales varían mucho de los primeros subgrupos, siendo evidente la diferencia de niveles de Malondialdehído. El grupo Control alcanzó los niveles más altos de MDA ya que sólo recibió acrilamida (4mg/kg/día). Así mismo, el estudio de Satya P. reporta valores más altos para el grupo que sólo recibió AA pero a una dosis de 25 mg/kg/día. <sup>(28)</sup>

La FIGURA N° 01 también muestra los niveles de malondialdehído a los 14 días, demostrando el efecto antioxidante del *Lepidium meyenii* (maca roja). Se observan valores disminuidos de MDA para los dos grupos Problemas comparados con el grupo Control I, donde el daño de la membrana eritrocitaria fue mayor ya que no contaron con ninguna sustancia protectora.

La acrilamida, sustancia altamente oxidante, al ser ingerida y metabolizada produce Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), esto debido a que la acción de la Citocromo P450 (CYP2E1) epoxida el enlace vinílico, dando un compuesto que se conoce como glicinamida de la cual se va a generar una gran cantidad de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), creándose así un desbalance entre los antioxidante y los oxidantes. La glicinamida puede establecer uniones covalentes con los grupos amino terminal de la hemoglobina e incluso iniciar la cascada de la peroxidación lipídica de las membranas. <sup>(3)</sup> Como resultado del desbalance de antioxidantes y oxidantes y de la lipoperoxidación lipídica se produce grandes cantidades de moléculas de Malondialdehído. Por lo tanto, podemos encontrar una elevada concentración de Malondialdehído.

En la TABLA N° 02 se muestran los niveles de MDA post inducción de 28 días con acrilamida en membrana hepáticas de *Rattus norvegicus* var. *albinus*. La Prueba de ANOVA arroja un  $P < 0.001$  (0.000) demostrando una alta significancia estadística al igual que en la TABLA N°01. La prueba de Duncan corrobora la diferencia estadística entre grupos (Blanco, Control II, Problema I y Problema II), separándose en 4 subgrupos: El subgrupo 1 incluye al grupo Blanco, el subgrupo 2 incluye al Problema IIb, siendo el resultado de éste último (3.76 nmol/mL de MDA) el más cercano al del grupo Blanco (1.26 nmol/mL). Lo cual demuestra que la doble dosis de maca roja para el Problema II (2g/kg/día) sigue siendo más efectiva en la disminución de los niveles de MDA, aún a los 28 días de inducción con acrilamida. Esto es comprobado con el subgrupo 3 donde encontramos al grupo Problema Ib (1g/kg/día) cuyo resultado promedio de MDA (5.51 nmol/mL) es un poco mayor al del Problema II, pero menor al del Control II (6.85 nmol/mL de MDA). Así mismo se observa tal efecto en la FIGURA N° 02.

Tras este análisis mediante las pruebas de ANOVA y Duncan se evidencia que a dosis de 2g/kg/día de maca (Problema II) la disminución de MDA es más significativa ( $P < 0.001$ ) que a dosis de 1g/kg/día de maca (Problema I) después de 14 y 28 días de inducción con acrilamida, confirmando el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Lepidium meyenii* (maca roja).

Esto se puede sustentar en que los especímenes del Problema I recibieron menor dosis de Maca Roja que el Problema II. La “Maca Roja”, a la cual se le atribuye poder antioxidante, ya que es un producto que contiene varios componentes con efecto antioxidante conocidos como el Zn, Fe, Cu y Mn, (cofactores de enzimas antioxidantes como Superóxido Dismutasa y Glutathion peroxidasa), metabolitos secundarios como los glucosinolatos p-metoxibencil, esteroides y/o triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides y/o cumarinas, taninos, glucósidos, saponinas, amina, almidón, fructosa, ácidos grasos poliinsaturados como las alcanidas (macamidas y macaenos), aceites naturales y vitaminas hidrosolubles como la Vitamina C y liposoluble como la vitamina E. Estos constituyentes poseen múltiples efectos positivos principalmente debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres, previniendo el desequilibrio entre los radicales libres y agentes antioxidante. Estos compuestos químicos como antioxidante dependen de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos como es el caso de los flavonoides y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química como de los macaenos, macamidas y otros constituyentes. <sup>(30)(24)(25)</sup>



## V. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii* “maca roja” presenta efecto antioxidante en dosis de 1 y 2 g /kg sobre lipoperoxidación inducida, disminuyendo los niveles de malondialdehído en membranas eritrocíticas de *Rattus norvegicus* var. *albinus*.
2. El extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii* “maca roja” en dosis de 2g/kg presenta mejor efecto antioxidante sobre lipoperoxidación inducida disminuyendo significativamente los niveles de malondialdehído ( $p < 0.001$ ) comparado con la dosis de 1g/kg. en membranas eritrocíticas de *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOTECNOLOGÍA

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Institutes of Health. (2009). Acrylamide. Disponible en: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+191>  
Consultado 03 abril 2014.
2. MORALES, F. (2002). Acrilamida ¿un riesgo para la salud del consumidor?. España. Instituto del frío. consejo superior de investigaciones científicas. p: 2.
3. BECALSKI A, BRADY B, FENG S, GAUTHIER BR, ZHAO T. (2011). Formation of acrylamide at temperatures lower than 100°C: the case of prunes and a model study. Food Additives and Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment; 28(6):726-30.
4. FENEMMA Owen. (1996). Química de alimentos. (3ª ed.) New York: Marcel Dekker. p: 75-131
5. BADUI, Salvador. (1999). Química de los Alimentos. (3ªed.) Mexico. Editorial Person. p: 152 – 155
6. CÉSPEDES C. y SÁNCHEZ S. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/car/vol14\\_1\\_00/car08100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/car/vol14_1_00/car08100.pdf) consultado 25 marzo 2014
7. CRAIG, E. THOMAS. (1997). Oxygen free radicals and human diseases Process. Biochemic. Netherlands. OPA. p: 77,147-6
8. VAN HAAFTEN R., HAENEN G., EVELO C., BAST A. (2003). Effect of vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. Drug Metab. Rev. 35: p: 215-253.
9. GIRALDO E. (2008). EPOC Diagnóstico y tratamiento integral con énfasis en la rehabilitación pulmonar. (3º Ed); Colombia. Editorial Médica Panamericana. p: 167-168.
10. GUTIÉRREZ-SALINAS J. ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres? Rev Mex Cien Farm 2006; 37: p: 69-73.

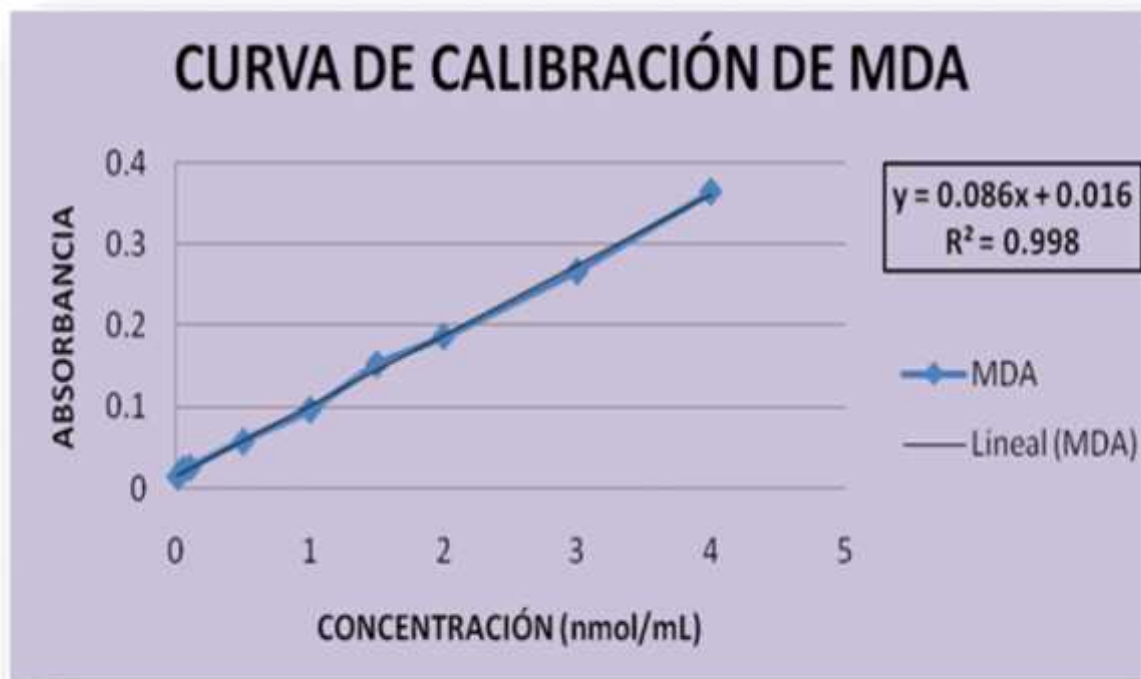
11. BECKMAN, K.B.; Ames, B.N. (1998) The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581
12. HALLIWELL B., (1995). How to characterize an antioxidant: an update, *Biochem. Soc. Symp.*, 61. p: 73-101.
13. REPETTO M. (2009). *Toxicología Fundamental*. (4º Ed). España. Editorial Díaz de Santos. p: 182-185
14. GUYTON, A. C. (2001) *Tratado de Fisiología Médica*, (10ª ed)., España. M. Graw-Hill. p: 261
15. BEUTLER, E., LICHTMAN, M. A., COLLER, B. S., KIPPS, T. J., AND SELIGSOHN, U. (1995). *Production and destruction of erythrocytes*, (6ª ed)., McGraw-Hill, NewYork. p: 160-167
16. BERLIN, N. I., AND BARK, P. D. (1975) *The Red Blood Cell*, (2 ed), Academic Press, New York .p: 126.
17. WALENSKY, L. D., MOHANDAS, N., AND LUX, S. E. (2003) *Blood, Principles and Practice of Hematology* (2ª ed), Lippincott Williams & Wilkins. p: 54-89.
18. REID, M. E., TAKAKUWA, Y., CONBOY, J., TCHERNIA, G., AND MOHANDAS, N. (1990). Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. *Blood* 75, 2229-34.
19. VERKLEIJ, A., ZWAAL, R., ROELOFSEN, B., COMFURIUS, P., KASTELIJN, D., AND VAN DEENEN, L. (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 323, 178-193
20. BENNETT, G. D., AND KAY, M. M. (1981). Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp Hematol* 9, 297-307.
21. OBREGON VILCHES, (1997). *Maca Planta Medicinal y Nutritiva del Perú*. Editorial. Instituto de Fitoterapia Americana. p: 34.
22. TELLEZ M.R., (2001). *Composition of the essential oil of Lepidium meyenii (maca); Natural products utilizations research unit, department of pharmacognosy, national*

- center for natural products research, research institute of pharmaceutical sciences, the University of Mississippi. p: 119 - 130.
23. GANZERA M, (2002). Chemical profiling and standardization of lepidium meyenii (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. Chem. Pharm. 50. p: 988-911.
  24. MUHAMMAD, I. (2002). Constituents of Lepidium meyenii (maca). Phytochemistry. 59. p: 105-110.
  25. MORA A, ARAGÓN D. (2009). Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. Colombia: revista de la facultad de química farmacéutica [revista en internet], [acceso 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/1698/169813261005.pdf>
  26. GUTIÉRREZ-SALINAS. (2009). Determinación de la concentración de Malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos. División de Investigación Biomédica, Laboratorio de Bioquímica y Medicina. p: 225 -227.
  27. BAST A., HAENEN G. R., Doelman C.J., (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art, Am. J. Med., 91. 2S-3S.
  28. SATYA P. (1983). Enhancement of lipid peroxidation in rat liver on acute exposure to styrene and acrylamide a consequence of glutathione depletion. p: 23 -50.
  29. FLORENCIA, T. (2012). Aplicación de N-Acetil cisteína como protector del daño a la membrana plasmática de los glóbulos rojos durante el almacenamiento en el banco de sangre. Uruguay. Facultad de Ciencias. p: 37. Disponible en: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15927>. Consultado 15 marzo 2014.
  30. GONZALES GF. (2006). Biological effect of Lepidium meyenii, Maca, a plant from the highlands of Perú. En: Singh VK, Bardwaj R, Govil JN, Sharma RK (Eds). Recent Progress in Medical plants. Natural Products. USA: Studium Press LLC;15:217

# ANEXOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA QUIMICA

### CURVA DE CALIBRACION DE MALONDIALDEHIDO (nmol/ml)



BIBLIOTECA DE F.

**CONCENTRACION EN (nM/ml ) DE MALONDIALDEHIDO EN SANGRE DEL DIA 14****GRUPO BLANCO**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| <b>1</b>    | 0.129              | 1.3116           |
| <b>2</b>    | 0.12               | 1.2070           |
| <b>3</b>    | 0.126              | 1.2767           |
| <b>4</b>    | 0.119              | 1.1953           |
| <b>5</b>    | 0.124              | 1.2535           |
| <b>6</b>    | 0.127              | 1.2884           |

**GRUPO CONTROL I**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| <b>1</b>    | 0.48               | 5.3930           |
| <b>2</b>    | 0.508              | 5.7186           |
| <b>3</b>    | 0.483              | 5.4279           |
| <b>4</b>    | 0.498              | 5.6023           |
| <b>5</b>    | 0.491              | 5.5209           |
| <b>6</b>    | 0.5                | 5.6256           |

**GRUPO PROBLEMA IA**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| <b>1</b>    | 0.323              | 3.5674           |
| <b>2</b>    | 0.315              | 3.4744           |
| <b>3</b>    | 0.31               | 3.4163           |
| <b>4</b>    | 0.32               | 3.5326           |
| <b>5</b>    | 0.301              | 3.3116           |
| <b>6</b>    | 0.317              | 3.4977           |

**GRUPO PROBLEMA IIA**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| <b>1</b>    | 0.267              | 2.9163           |
| <b>2</b>    | 0.27               | 2.9512           |
| <b>3</b>    | 0.263              | 2.8698           |
| <b>4</b>    | 0.258              | 2.8116           |
| <b>5</b>    | 0.269              | 2.9395           |
| <b>6</b>    | 0.277              | 3.0326           |



**CONCENTRACION EN (nM/ml ) DE MALONDIALDEHIDO EN SANGRE DEL DIA 28****GRUPO BLANCO**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| 1           | 0.129              | 1.3116           |
| 2           | 0.12               | 1.2070           |
| 3           | 0.126              | 1.2767           |
| 4           | 0.119              | 1.1953           |
| 5           | 0.124              | 1.2535           |
| 6           | 0.127              | 1.2884           |

**GRUPO CONTROL I**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| 1           | 0.611              | 6.9163           |
| 2           | 0.602              | 6.8116           |
| 3           | 0.608              | 6.8814           |
| 4           | 0.615              | 6.9628           |
| 5           | 0.598              | 6.7651           |
| 6           | 0.600              | 6.7884           |

**GRUPO PROBLEMA IB**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| 1           | 0.483              | 5.4279           |
| 2           | 0.494              | 5.5558           |
| 3           | 0.490              | 5.5093           |
| 4           | 0.486              | 5.4628           |
| 5           | 0.499              | 5.6140           |
| 6           | 0.487              | 5.4744           |

**GRUPO PROBLEMA IIB**

| <b>RATA</b> | <b>ABSORBANCIA</b> | <b>CC. nM/ml</b> |
|-------------|--------------------|------------------|
| 1           | 0.345              | 3.8233           |
| 2           | 0.332              | 3.6721           |
| 3           | 0.339              | 3.7535           |
| 4           | 0.333              | 3.6837           |
| 5           | 0.347              | 3.8465           |
| 6           | 0.34               | 3.7651           |

## PREPARACION Y ADMINISTRACION DE MACA

*Lepidium meyenii* (maca roja)



Agua bidestilada



Extracto hidroalcohólico de *Lepidium meyenii*



Sonda alimentaria N° 4 y demás utensilios para la administración del extracto hidroalcohólico de maca roja



## PREPARACION Y ADMINISTRACION DE ACRILAMIDA

Acrilamida q.p.



963.2 mg de acrilamida para la preparación



Cámara de flujo laminar para la preparación de acrilamida



Dilución de acrilamida en cámara de flujo laminar



BIBLI.



Acrilamida diluida

## OBTENCION DE LA MUESTRA DE SANGRE

Especímenes listos para la extracción de muestra



Obtención de la muestra por punción cardiaca



Sangre obtenida en tubo con EDTA



BIBLIOTECA DE FARMACIA

**DETERMINACION DE NIVELES DE MALONDIALDEHIDO EN MEMBRANA ERITROCITARIA DE**  
*Ratus norvegicus var albinus.*

Centrifugación de la sangre  
para la obtención de la  
membrana eritrocitaria



Muestra centrifugada



Incubación en Baño maría  
por 60 minutos a 37<sup>a</sup>C



Adición de 1,5ml de ácido  
acético 5% v/v



Incubación de las muestras  
por 60 minutos a 90°C



Extracción en frío de  
aductos de MDA-TBARS

