



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y efecto regenerador *in vivo* de una crema cosmética con extracto liofilizado de mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética

AUTOR

Rosmery JUNES OLIVERA

ASESOR

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2017



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

Junes R. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y efecto regenerador *in vivo* de una crema cosmética con extracto liofilizado de mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

588



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANIA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR

AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS CON MENCIÓN EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA COSMÉTICA

Siendo las **08:30 hrs. del 03 de mayo de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (Asesor), Dra. Norma Julia Ramos Cevallos, Mg. Bertran Santiago Trujillo y la Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* Y EFECTO REGENERADOR *in vivo* DE UNA CREMA COSMÉTICA CON EXTRACTO LIOFILIZADO DE MASHUA (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*)"**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **ROSMERY JUNES OLIVERA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Ciencias Farmacéuticas con Mención en Ciencia y Tecnología Cosmética**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

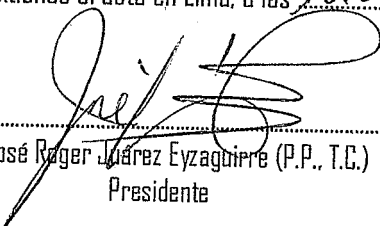
A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Muy BUENO (18)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **ROSMERY JUNES OLIVERA**, el Grado Académico de Magíster en **Ciencias Farmacéuticas con Mención en Ciencia y Tecnología Cosmética**.

Siendo las 10.00 hrs. se levanta la sesión.

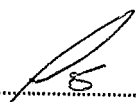
Se extiende el acta en Lima, a las 10.00 hrs. del 03 de mayo de 2017.


.....
Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre (P.P., T.C.)
Presidente


.....
Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P.P., T.C.)
Miembro - Asesor


.....
Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P. Aux., T.C.)
Miembro


.....
Mg. Bertran Santiago Trujillo (P. Aux., T.P.)
Miembro


.....
Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:
.....

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida, por estar a mi lado cada día, por ser la luz que guía mi sendero, por darme la fortaleza necesaria para levantarme y seguir avanzando, por ser la fuente de amor, de esperanzas y de sueños que llenan mi vida.

A mis padres por brindarme su cariño, su apoyo incondicional y por darme la mejor herencia, una carrera profesional, basada en principios y valores.

A mi hermano Gregory, por ser mi mejor amigo y compañero toda mi vida, por su apoyo, comprensión.

A mi pequeña hija Stefany Andrea, quien con su sonrisa me ilumina y me llena de alegría, mi motor y motivo para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis Dr. Pablo Bonilla Rivera, por su apoyo y asesoría en este trabajo de investigación.

A mi compañera y colega Irene Ramos por su apoyo en momentos difíciles, por contagiarme su optimismo y ayudarme a no desistir de este sueño.

A mi colega Miguel Inocente Camones, por su apoyo en este trabajo.

Al licenciado Julio Hidalgo y el Sr. Juan Cueva por su ayuda en la obtención del extracto y el bioensayo.

Un especial agradecimiento al Dr. José Ráez, quien contribuyó muchísimo para la realización de esta investigación, brindándome sus conocimientos y experiencias.

Finalmente a todas las personas que se cruzaron en mi camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Justificación teórica.....	3
1.4 Justificación práctica.....	5
1.5 Objetivos	5
1.5.1. Objetivo general.....	5
1.5.2. Objetivos específicos	6
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes de la investigación	7
2.2 Bases teóricas	8
2.2.1 Estudio botánico	8
2.2.2. Radicales Libres.....	12
2.2.3. Antioxidantes	13
2.2.4. Metabolitos secundarios con actividad antioxidante	14
2.2.5. La piel y el fotoenvejecimiento	16
2.2.6. Liofilización	16
CAPITULO III: METODOLOGÍA	18
1.1. Materiales, equipos y otros	18
3.1.1 Material biológico	18
3.1.2 Materiales y equipos de laboratorio	18
3.1.3 Reactivos, drogas y otros.....	19
3.2 Flujograma de la investigación	20
3.3 Métodos.....	21
3.3.1 Recolección, identificación del material botánico	21
3.3.2 Elaboración del extracto de mashua.....	21
3.3.3 Formulación de la crema cosmética con el extracto.....	23
3.3.4 Cuantificación de los compuestos fenólicos totales	25
3.3.5 Cuantificación de vitamina C.....	26
3.3.6 Evaluación de la actividad antioxidante in vitro.....	27

3.3.7	Determinación del efecto regenerador <i>in vivo</i>	29
3.3.8	Análisis estadístico	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		35
4.1	Resultados	35
4.1.1	Análisis organoléptico del extracto liofilizado de mashua.....	35
4.1.2	Análisis organoléptico y microbiológico de la crema	36
4.1.3	Prueba de estabilidad preliminar: estrés cíclico de la crema	37
4.1.4	Contenido de compuestos fenólicos totales	37
4.1.5	Contenido de vitamina C.....	38
4.1.6	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto y de la crema	38
4.1.7	Efecto regenerador <i>in vivo</i> de la crema con extracto	39
4.2	Discusión	41
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....		44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la mashua.....	11
Tabla 2. Valores asignados para la evaluación del estado de la piel por capa.	31
Tabla 3. Valores asignados según el estado de la piel.....	32
Tabla 4. Valores de los indicadores de inflamación considerados para la evaluación del nivel de inflamación de la piel.	32
Tabla 5. Valores asignados según el nivel de inflamación.	33
Tabla 6. Resultados del análisis organoléptico del extracto.	35
Tabla 7. Resultados del análisis de la crema con extracto de mashua.....	36
Tabla 8. Resultados del análisis de la crema sometida a estrés cíclico.	37
Tabla 9. Contenido de compuestos fenólicos totales del extracto	37
Tabla 10. Contenido de vitamina C del extracto.....	38
Tabla 11. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro del extracto de mashua	38
Tabla 12. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de la crema con extracto... ..	38
Tabla 13. Determinación del efecto regenerador in vivo, en base al estado de la piel por cada grupo de ensayo.	39
Tabla 14. Determinación del efecto regenerador in vivo, en base al nivel de inflamación de la piel por cada grupo de ensayo.....	40
Tabla 15. Resultados obtenidos para elaborar la curva de calibración de ácido gálico.....	62
Tabla 16. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos del extracto liofilizado de mashua	62
Tabla 17. Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos del extracto liofilizado, obtenido del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón (mashua), expresado en Equivalentes mg ácido gálico/ g extracto liofilizado	62
Tabla 18. Resultados obtenidos para elaborar la curva de calibración de ácido ascórbico.....	63
Tabla 19. Resultados de la cuantificación de vitamina C del extracto de mashua	63
Tabla 20. Cuantificación del contenido de vitamina C del extracto liofilizado, obtenido del tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón (mashua), expresado en equivalentes mg ácido ascórbico / g extracto	63
Tabla 21. Resultados obtenidos para elaborar la curva de calibración de ácido ascórbico.....	64
Tabla 22. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante del extracto de mashua.....	64

Tabla 23. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de la crema con extracto	64
Tabla 24. Asignación de valores según el estado de la piel por grupos.....	65
Tabla 25 Pruebas de normalidad	66
Tabla 26. Comparaciones entre los grupos en relación al estado de la piel	66
Tabla 27. Comparaciones por pares de los grupos	67
Tabla 28. Asignación de valores según el nivel de inflamación de la piel	68
Tabla 29. Estado de piel por capas según grupo	69
Tabla 30. Indicadores de inflamación según grupo	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo que representa el daño de la radiación UV al tejido conectivo,.....	2
Figura 2. Mashua. Planta y tubérculos.....	9
Figura 3. Tubérculos de Mashua.....	10
Figura 4. Clasificación de los compuestos fenólicos.	15
Figura 5. Flujograma de la Investigación	20
Figura 6. Flujograma de la obtención del extracto liofilizado	22
Figura 7. Flujograma de la fabricación de la crema con extracto	23
Figura 8. Curva de calibración del ácido gálico (ppm)	26
Figura 9. Curva de calibración del ácido ascórbico (ppm)	27
Figura 10 Curva de calibración del % de inhibición del ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mL}$) frente al radical DPPH	28
Figura 11. Área de aplicación de la crema en el lomo depilado del ratón.	30
Figura 12. Aspecto del extracto liofilizado de mashua	35
Figura 13. Dispersabilidad del extracto liofilizado de mashua.....	36
Figura 14. Aspecto de la crema con extracto liofilizado de mashua.	37
Figura 15. Determinación del efecto regenerador <i>in vivo</i>, en base al estado de la piel por cada grupo de ensayo.	39
Figura 16. Determinación del efecto regenerador <i>in vivo</i>, en base al nivel de inflamación de la piel por cada grupo de ensayo.....	40

ANEXOS

ANEXO 1. Constancia de Identificación de los tubérculos de mashua	52
ANEXO 2. Protocolo de análisis del extracto liofilizado de mashua	53
ANEXO 3. Protocolo de análisis de la crema con extracto de mashua	54
ANEXO 4. Análisis microbiológico de la crema con extracto de mashua	55
ANEXO 5. Diagnóstico microscópico por análisis histológico.....	56
ANEXO 6. Resultados y análisis estadístico de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto de mashua	62
ANEXO 7. Resultados y análisis estadístico del ensayo <i>in vivo</i> para determinar el efecto regenerador de la crema	65
ANEXO 8. Cálculos para la expresión de resultados en relación a los tubérculos frescos	70

RESUMEN

La mashua es un tubérculo originario de los andes centrales, que se desarrolla entre los 3500 y 4100 metros de altitud. Tiene una actividad antioxidante importante por su contenido en compuestos fenólicos y ácido ascórbico. El objetivo fue determinar la actividad antioxidante *in vitro* y el efecto regenerador *in vivo* de una crema cosmética elaborada con extracto liofilizado de *Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón* (mashua). Este estudio fue de tipo experimental, descriptivo y transversal. Se preparó un extracto acuoso a partir de los tubérculos frescos de mashua y se sometió a un proceso de liofilización. El extracto liofilizado obtenido, fue incorporado en una crema; luego se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de la crema mediante la utilización del radical libre y estable DPPH. Por otro lado, la crema fue utilizada como tratamiento sobre la piel fotodañada de ratones y luego se determinó el efecto regenerador de la misma, mediante evaluaciones histológicas. En los resultados se obtuvo que el contenido de ácido ascórbico en el extracto liofilizado fue de 42,649 mg Eq. AA. / 100 g de tubérculos frescos; mientras el contenido de compuestos fenólicos totales fue de 87,227 mg AG. /100 g de tubérculos frescos. Con respecto a la capacidad del extracto de reaccionar con el radical DPPH, las IC₅₀ encontradas fueron 383,515 µg/mL para el extracto y 1841,457 µg/mL para la crema. En el estudio *in vivo*, las características de los cortes histológicos obtenidos a partir de la piel fotodañada tratada con la crema que contiene extracto liofilizado de mashua, fueron similares a los cortes provenientes de los ratones del grupo blanco (grupo no expuesto a radiación UVC). Los resultados muestran que el extracto de mashua posee un potencial antioxidante moderado relacionado con el contenido de compuestos fenólicos totales y ácido ascórbico. Así mismo la crema con extracto liofilizado de mashua tiene efecto regenerador *in vivo* relacionado al estado de la piel y la inflamación después del tratamiento.

Palabras clave: antioxidante, regeneradora, mashua, radiación UVC.

SUMMARY

The mashua is a tuber originating in the central Andes, which develops between 3500 and 4100 meters in altitude. It has an important antioxidant activity due to its content in phenolic compounds and ascorbic acid. The objective was to determine the antioxidant activity *in vitro* of the lyophilized extract of *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) and the regenerative effect *in vivo* of the cosmetic cream made with the extract. This study was experimental, descriptive and cross-sectional. An aqueous extract was prepared from fresh mashua tubers and subjected to a lyophilization process. The obtained lyophilized extract was incorporated in a cream; Then the *in vitro* antioxidant activity of the extract was evaluated by using the free radical and stable DPPH. On the other hand, the cream with extract was used as a treatment on photodamaged skin of mice and then the regenerative effect was determined by histological evaluations. In the results it was found that the ascorbic acid content in the lyophilized extract was 42,649 mg Eq. AA. / 100 g of fresh tubers; While the content of total phenolic compounds was 87,227 mg AG. / 100 g of fresh tubers. With respect to the ability to react with the DPPH radical, the IC 50 found was 383,515 µg / mL for the extract y 1841.457 µg / mL for the cream. In the *in vivo* study, the characteristics of the histological sections obtained from the photodamaged skin treated with the cream containing lyophilized mashua extract were similar to the histological sections from the white group mice (group not exposed to UVC irradiation). The results show that the extract of mashua possesses a moderate antioxidant potential related to the content of total phenolic compounds and ascorbic acid. Likewise, the cream with lyophilized mashua extract has regenerative effect *in vivo* related to the state of the skin and inflammation after treatment.

Key words: antioxidant, regenerative, mashua, UVC irradiation.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

El daño foto-oxidativo, debido a la absorción de energía de los fotones de UV en un ambiente oxigenado, lleva a la alteración cuantitativa y cualitativa de las células y macromoléculas estructurales del tejido conectivo de la dermis responsables de dar la fuerza, resistencia y estabilidad a la piel. (Ma *et al.*, 2001, citado por Gonzáles, 2009)

La radiación UV invoca una secuencia compleja de respuestas moleculares específicas que dañan el tejido conectivo de la piel. La maquinaria celular que media el daño de la radiación UV al tejido conectivo de la piel humana incluye receptores de superficie celular, vías de transducción de señales de proteína quinasa, factores de transcripción y enzimas que sintetizan y degradan proteínas estructurales en la dermis que confieren resistencia y elasticidad a la piel. La interacción de la radiación UV sobre la maquinaria celular que generan daños al tejido conectivo de la piel se inician por la generación fotoquímica de especies reactivas de oxígeno (EROs). Las especies reactivas de oxígeno inducidas por la radiación ultravioleta también causan modificaciones químicas deletéreas directas a los componentes celulares (ADN, proteínas y lípidos). La oxidación química de los componentes celulares y la activación de la maquinaria celular, provocadas por el estrés oxidativo inducido por la radiación UV, actúan conjuntamente para provocar el fotoenvejecimiento.

En la figura 1 se observa como la radiación ultravioleta activa los receptores del factor de crecimiento y citoquinas en la superficie de los queratinocitos y fibroblastos. Los receptores activados estimulan la cascada de señales de transducción que inducen la transcripción del factor AP-1 (proteína activadora 1), el cual estimula la transcripción de genes de las metaloproteinasas de la matriz (MMP). En los fibroblastos, AP-1, también inhibe la expresión del gen pro-colágeno. Las metaloproteinasas de la matriz son secretados por los queratinocitos y fibroblastos, y degradan el colágeno y otras proteínas que

comprenden la matriz extracelular dermal. La reparación imperfecta del daño dérmico perjudica la integridad funcional y estructural de la matriz extracelular. La exposición repetida al sol provoca acumulación de daño dérmico que eventualmente resulta en arrugas características de la piel fotodañada (Fisher, *et al.*, 2002).

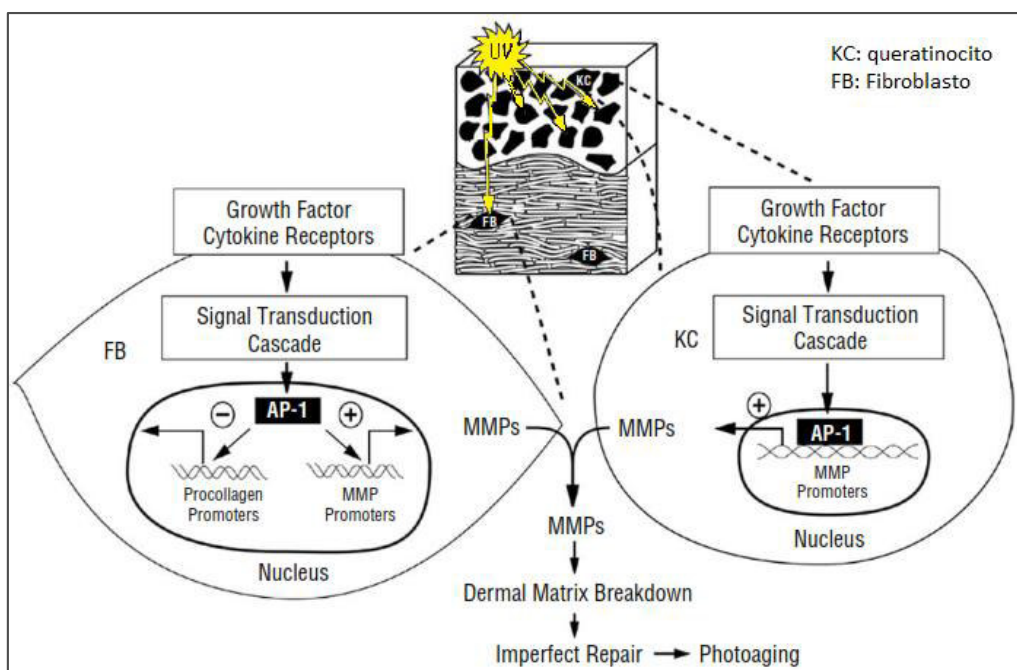


Figura 1. Modelo que representa el daño de la radiación UV al tejido conectivo,

EROs regulan la transcripción del factor nuclear kappa B (NF- κ B), dando como resultado la síntesis de una variedad de citoquinas proinflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral α , interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8. EROs también son conocidos por incrementar el RNAm de elastina en fibroblastos dermicos, lo que puede explicar los cambios elásticos que caracterizan la piel actinicamente dañada. (Farris y O'Donoghue, 2009)

La inflamación y la producción de EROs son dos causas del fotoenvejecimiento. (Pillai, Oresajo y Hayward, 2005). De hecho, estos dos procesos se alimentan mutuamente aumentando sus efectos bioquímicos acumulativos en el sentido descendente. Con el tiempo, la radiación ultravioleta agota los antioxidantes celulares y disminuye la eficacia de los sistemas de enzimas antioxidantes, lo que culmina en el daño del ADN. La acumulación de dímeros de timidina activa

el sistema neuroendocrino para provocar una mayor liberación de mediadores proinflamatorios. En adición, la inflamación y los EROs causan daño oxidativo sobre proteínas, lípidos y carbohidratos celulares. Estas moléculas se acumulan en los compartimentos dérmico y epidérmico, contribuyendo a la etiología del fotoenvejecimiento. (Natarajan, *et al.*, 2014)

El conocimiento de los mecanismos del fotoenvejecimiento e inflamación de la piel; por acción de los radicales libres, inducidos por la radiación UV, nos permite evaluar alternativas de tratamiento a través del uso de antioxidantes naturales contenidos en las plantas; con la finalidad de contrarrestar y prevenir los efectos negativos causados por la exposición a la radiación UV.

1.2 Formulación del problema

La crema cosmética elaborada con extracto liofilizado de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón “mashua” posee actividad antioxidante *in vitro* y efecto regenerador *in vivo*?

1.3 Justificación teórica

Los productos tópicos dermatológicos que contienen antioxidantes son utilizados a fin de proteger la piel humana contra el daño causado por la radiación ultravioleta y por las especies reactivas de oxígeno. (Chermahini, Majid y Sarmidi, 2011)

Los antioxidantes tópicos, de acuerdo a su función, se pueden dividir en primarios y secundarios o naturales y sintéticos. Los primarios comprenden minerales tales como: selenio, cobre, hierro, zinc y manganeso, vitaminas C y E, y fitoantioxidantes. Generalmente un mineral es un cofactor de antioxidantes enzimáticos. Las funciones de los antioxidantes secundarios o sintéticos son la captura de las especies reactivas de oxígeno y la terminación de la reacción en cadena.

Las plantas también tienen que protegerse del sol; de hecho, tienen un mejor mecanismo de defensa para evitar oxidarse y morir, ya que son incapaces de moverse para evitar la luz solar. Así tenemos que, la mayoría de plantas sintetizan vitaminas C y E, además de compuestos fenólicos como flavonoides, los cuales son poderosos antioxidantes. (Oresajo, Pinell, 2011)

La vitamina C ayuda a neutralizar los radicales libres donando un electrón y generando un radical libre más estable: ascorbato; y luego donando un segundo electrón que da como resultado ácido dehidroascórbico, el cuál puede ser descompuesto por la dehidroascorbato reductasa o convertido nuevamente en ácido L-ascórbico. La vitamina C sirve de cofactor de la prolil y lisil hidroxilasas, enzimas esenciales para la síntesis de colágeno. Estudios han demostrado que la vitamina C es importante para preservación del colágeno dérmico, aumentando la estabilidad y disminuyendo la sensibilidad al calor del colágeno. La vitamina C tiene actividad antiinflamatoria. Cultivos de células humanas cargados con vitamina C mostró una reducción en la actividad de transcripción del factor NF- κ B. Se cree que esta regulación a la baja se produce bloqueando la TNF- α inducida por la activación de NF- κ B. (Farris, *et al.*, 2009)

Las propiedades fotoprotectoras de la aplicación tópica de la vitamina C han sido demostradas, convirtiendo a esta molécula en un candidato potencial para el uso en la prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento. (Humbert, *et al.*, 2003)

Los fitoantioxidantes son, sobre todo, polifenoles y terpenos; diferenciación basada en su peso molecular, polaridad y solubilidad. Los polifenoles tienen grupos hidroxilo (OH) unidos al anillo benceno. Su actividad como antioxidante se determina por el número y la posición de los grupos OH en el anillo. Grupos fenólicos modulan la fosforilación de proteínas por su capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos (como eliminadores de radicales peróxido de rotura de cadena). Los flavonoides y estilbenos son el mayor grupo de los polifenoles, mientras que el grupo más grande de terpenos son carotenoides que sirven como oxígeno singlete inactivadores (Magliano, 2014)

En la actualidad, se prefiere el uso de antioxidantes naturales, derivados de plantas, en lugar de los antioxidantes sintéticos para la elaboración de productos cosméticos y dermocosméticos.

Los extractos de origen vegetal contienen generalmente una mezcla de compuestos naturales, que podrían tener acciones sinérgicas; por lo tanto, inducir mejores efectos y menos toxicidad. (Chermahini *et al.*, 2011)

Estudios recientes indican que mashua contiene un alto contenido de ácido ascórbico, compuestos fenólicos, antocianinas, así como un importante contenido de actividad antioxidante hidrofílica. (Campos *et al.*, 2006; Chirinos *et al.*, 2007; Collazos *et al.*, 1993 y Temoche *et al.*, 2004).

1.4 Justificación práctica

Actualmente, la industria global de productos cosméticos demanda y está en la búsqueda constante de nuevos ingredientes naturales especialmente con propiedades anti-edad. La biodiversidad peruana tiene un gran potencial para ofrecer al mercado; sin embargo, hasta el momento son pocos los estudios científicos realizados sobre recursos vegetales peruanos que demuestren la seguridad de su uso o su eficacia en retardar el envejecimiento de la piel.

Por lo expuesto anteriormente, con este estudio se busca determinar la actividad antioxidante *in vitro* y el efecto regenerador *in vivo* de una crema cosmética con extracto de mashua en pieles fotodañadas por la radiación UVC.

1.5 Objetivos

1.5.1. *Objetivo general*

Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* y el efecto regenerador *in vivo* de una crema cosmética con extracto de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón “mashua”

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar el contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico en el extracto liofilizado de mashua.
- Determinar la concentración inhibitoria media (IC50) del extracto y de la crema.
- Determinar el efecto regenerador de la crema con extracto de mashua, sobre la piel fotodañada de ratones en base al estado de las capas de la piel y al nivel de inflamación después del tratamiento tópico con la crema.
- Realizar los estudios de estabilidad preliminar de la crema cosmética, elaborada con el extracto de mashua.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Las investigaciones realizadas por Chirinos *et al.* (2007) indican que contiene importantes concentraciones de compuestos fenólicos (174,9 – 374,4 mg. AGE/100 g MF), antocianinas (45,5 – 131,9 mg CGE / 100 g MF), flavanoides (0,2 – 5,3 mg/g MS) y una actividad antioxidante hidrofílica importante, equivalente a 80 – 378 μ moles TE/ g MS, similar o superior a las del arándano, fresa, pasas, grosella, frambuesa, manzana, entre otras.

Campos *et al.* (2006) señalan que, en los tubérculos de mashua, el contenido de compuestos fenólicos totales se encuentra en el rango de 0,92 a 3,37 mg/g. Los genotipos de mashua de color púrpura, presentaron alto contenido de compuestos fenólicos totales, mientras que los genotipos de mashua color amarillo presentaron bajo contenido. Las antocianinas totales del genotipo de mashua pigmentadas se encuentran en el rango de 0,5 a 2,05 mg/g, encontrándose este resultado dentro de lo reportado para las fresas, 1,38 – 3,85 mg/g. De otro lado, mencionan que los tubérculos de mashua contienen carotenoides totales que se encuentran en el rango de 1 a 25 μ g β -caroteno/g. Los contenidos de carotenoides de los tubérculos de mashua son relativamente elevados comparados con la papa comercial y papas nativas, también es comparado con el contenido en papaya (4,08 μ g/g). Sin embargo, el contenido de carotenoides de mashua es reducido respecto a tomate (56 – 210 μ g /g), mango (74,3 μ g/g) y zanahoria (90 \pm 16 μ g/g).

Chirinos, *et al.* (2007) mencionan que la baja correlación de algunos cultivares de mashua puede indicar diferencias en los promedios de perfiles de compuestos fenólicos o la presencia de otros compuestos bioactivos que pueden contribuir a la actividad antioxidante incluyendo ácido ascórbico y glucosinolatos.

La mashua presenta un contenido alto de ácido ascórbico, de aproximadamente 77,37 mg/ 100g de materia fresca. (Barrera, *et al.*, 2004)

Chirinos, *et al.* (2008) determinó *in vitro* que el extracto fenólico de mashua puede inhibir la oxidación de LDL inducido por radical 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) y Cu^{2+} . Sus resultados indican que los compuestos fenólicos de la mashua son capaces de barrer los radicales de peróxido. Se presume que este efecto protector del extracto de mashua depende de su composición de fenólicos en términos de partición lipofílica/hidrofílica y de sus estructuras moleculares que definen su reactividad contra los radicales libres. El estudio sugiere que los compuestos fenólicos de la mashua proveen de un excelente antioxidante en la dieta y pueden ofrecer un potencial efecto contra la oxidación lipídica, lo cual podría ser explotado por la industria alimentaria y cosmética.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Estudio botánico

(1) Características botánicas del cultivo de mashua.

La mashua, conocida también como “añu”, “isaño” o “cubio”, es una planta herbácea perenne originaria de la región andina, donde también fue domesticada. Las evidencias arqueológicas sugieren que sus tubérculos ya eran consumidos desde hace más de 7500 años. Su hábitat de distribución natural se extiende desde Colombia hasta el norte de Argentina, entre los 2400 hasta los 4300 msnm, y desde hace algunas décadas se cultiva también en algunas regiones de Nueva Zelanda y Canadá. Las mayores áreas de siembra se encuentran en Perú y Bolivia, donde generalmente se cultiva en asociación con otros tubérculos, como *Oxalis tuberosa* (oca), *Ullucus tuberosus* (ulluco) y *Solanum tuberosum*, *S. curtilobum*, *S. ajanhuiri*, *S. juzepczukii*, *S. phureja*, *S. curtilobum*, *S. chaucha*. Aunque el área de siembra de la mashua es mucho menor al de las otras tuberosas andinas, su cultivo no deja de ser importante, pues forma parte de la seguridad alimentaria de miles de familias

campesinas en los Andes a través del autoconsumo o la generación de ingresos monetarios. (Manrique, 2014)

La planta es inicialmente erecta, aunque a la madurez es semiprostrada. La forma de la hoja es ovalada, la cara superior es verde mate y la cara inferior verde claro. Puede ser de tres, cuatro o cinco lóbulos. Las flores solitarias nacen en las axilas de las hojas. Los tubérculos tienen yemas alargadas y profundas, son de forma cónica o elipsoidal (Figura 2). (Tapia y Fries, 2007).

Los tubérculos se producen sobre estolones axilares que se agrandan para formar tubérculos terminales, alargados, cónicos o elipsoidales. El tamaño de los tubérculos fluctúa entre 5 a 15 cm de largo por 3 a 6 cm de ancho. Poseen una superficie cerosa. El color de los tubérculos es variable: blanco, amarillo, rojo, rosado o morado; a menudo rayados o moteados de rojo o morado, especialmente debajo de los ojos tal como se aprecia en la figura 3. (Lim, 2016)



Figura 2. Mashua. Planta y tubérculos.
Fuente: Lim, 2016



Figura 3. Tubérculos de Mashua
Fuente: Lim, 2016

(2) *Clasificación taxonómica.*

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnolipsida
- **Subclase:** Rosidae
- **Orden:** Geraniales
- **Familia:** Tropaeolaceae
- **Género:** Tropaeolum
- **Especie:** *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón.

(3) *Composición química y nutricional de la mashua.*

El contenido de agua de los tubérculos de mashua es relativamente alto, oscilando entre 79 a 94 % de la materia fresca o comestible. La principal contribución nutricional que proporciona es su elevado valor energético debido al alto contenido de carbohidratos, particularmente almidón y azúcar, que supera en casi seis veces a la concentración de proteína. Además, posee un alto contenido de ácido ascórbico (77,37 mg / 100 g de materia fresca), tal como se observa en la tabla 1. (Grau *et al.*, 2003; Barrera *et al.*, 2004)

Tabla 1. Composición química de la mashua.

Componentes	Rango
Humedad (%)	88,70
Carbohidrato total (g)	75,40
Proteínas (%)	9,17
Ceniza (%)	4,81
Fibra (%)	5,86
Extracto etéreo (%)	4,61
Potasio (%)	1,99
Fósforo (%)	0,32
Calcio (%)	0,006
Magnesio (%)	0,11
Sodio (%)	0,044
Cobre (ppm)	9,00
Hierro (ppm)	42,00
Manganeso (ppm)	7,00
Zinc (ppm)	48,00
Almidón (%)	46,92
Azúcar total (%)	42,81
Azúcares reductores (%)	35,83
Energía Kcal/100g	440,0
Eq. Retinol (Eq/100 mf)	73,56
Vitamina C (mg/100 mf)	77.37

Fuente Espin, et al. (2004)

Datos expresados en base seca, mf: materia fresca.

Por otro lado, si bien el contenido de proteínas no es elevado, Grau *et al.* (2003) mencionan que el análisis de aminoácidos de mashua mostró una composición nutricional satisfactoria con la recomendada por la World Health Organization (WHO).

Como en otras tropaeoláceas mashua contiene isotiocianatos presentes como glucosinolatos. Sin cocinar se han encontrado valores de tiocianatos tan altos como 20mg/100 g (Johns y Towers, 1981 citados por Grau *et al.*, 2003)

Ramallo (2004) determinó el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (79,8%), obteniendo una relación poliinsaturados/saturados de 3,0. Así mismo, determinó la relación linoleico/ α -linolenico de 2,2.

(4) *Usos.* La mashua tiene importancia porque satisface la alimentación de los habitantes de menores recursos en zonas marginales de los Andes altos (Pérez, 2005)

Su consumo en la dieta humana se realiza de diversas formas. No se ingiere en forma cruda debido a su alto contenido en isotiocianatos, los cuales además de brindar un sabor astringente y desagradable, proporcionan toxicidad. (Grau *et al.*, 2003)

La mashua tiene varias aplicaciones en la medicina folklórica. Sus propiedades antimicrobianas y nematocidas están relacionadas con la presencia de isotiocianatos y permiten su empleo en el tratamiento de úlceras de la piel, eczemas y manchas (Costa, 2008). También se usa para tratar dolencias renales. (Ortega, 2006 citado por Lim, 2016)

Vásquez, *et al.* (2012) demostró que la mashua posee una acción directa sobre el sistema reproductor masculino, disminuyendo los parámetros espermáticos, sin ejercer efectos tóxicos en los ratones. Así la mashua es considerada un agente inhibidor sexual.

2.2.2. *Radicales Libres*

Los radicales libres no son completamente dañinos, ya que nuestro propio organismo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus; son producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones. El problema para nuestras células se produce

cuando se da un exceso sostenido de radicales libres en nuestro sistema, a través de los años, situación en la cual nuestro sistema antioxidante requiere de los antioxidantes de la dieta. (Oliveira, 2014)

El cambio en el equilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes a favor de los oxidantes se denomina "estrés oxidativo"; el cual contribuye a muchas condiciones y enfermedades patológicas. (Birbe, *et al.*, 2012)

El estrés oxidativo produce daño en las células debido a la oxidación de los lípidos, proteínas, DNA y enzimas, lo que deriva en una reacción en cadena, que genera mayor producción de radicales libres y por lo tanto, aumento del daño celular (Mesa-Vanegas, 2010)

La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente, nos obliga a recurrir a nutrientes que tengan la propiedad de neutralizarlos. (Gutiérrez, 2006)

2.2.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que inhiben o contrarrestan las reacciones de radicales libres y retrasan o inhiben el daño celular. (Young y Woodside, 2001)

Según su modo de acción es posible diferenciar a los antioxidantes denominados primarios, debido a que actúan interrumpiendo la reacción en cadena que producen los radicales libres y generando como consecuencia de ello un radical libre menos activo; también es posible observar la existencia de antioxidantes secundarios, que tienen acción preventiva y actúan atrapando los iones metálicos que producen la descomposición del peróxido de hidrógeno, generando como consecuencia de ello el radical hidroxilo. (Pastene, Gómez, Speisky y Núñez-Vergara, 2009)

Los antioxidantes naturales han alcanzado gran importancia por la relación directa que manifiestan con la disminución del riesgo a producir enfermedades coronarias y cáncer, entre otras. Numerosos antioxidantes, presentes en las frutas y verduras, entre los cuales se encuentran: vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno (pro-vitamina A), compuestos fenólicos y flavonoides, se han relacionado a efectos positivos en la salud debido a su efecto antioxidante. (Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca, 2009)

2.2.4. *Metabolitos secundarios con actividad antioxidante*

- a. ***Compuestos fenólicos.*** Los compuestos polifenólicos, son los antioxidantes más abundantes de la dieta, cumplen esta acción gracias a su propiedad quelante de metales de transición y su acción atrapadora de radicales libres (Pérez, 2003).

Fennema (2000) menciona que, debido a su estructura química, los compuestos fenólicos resultan ser más eficaces donadores de electrones o átomos de hidrógeno, atribuyéndole a esta conformación estructural el alto potencial antioxidante.

Se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello, la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es unida a glucósidos, haciéndolos más solubles en agua y solventes orgánicos (Naczk y Shahidi, 2004)

Entre los compuestos fenólicos existentes en los alimentos se pueden distinguir dos grandes familias (figura 4). (García, 2005 citado por Costa, 2008)

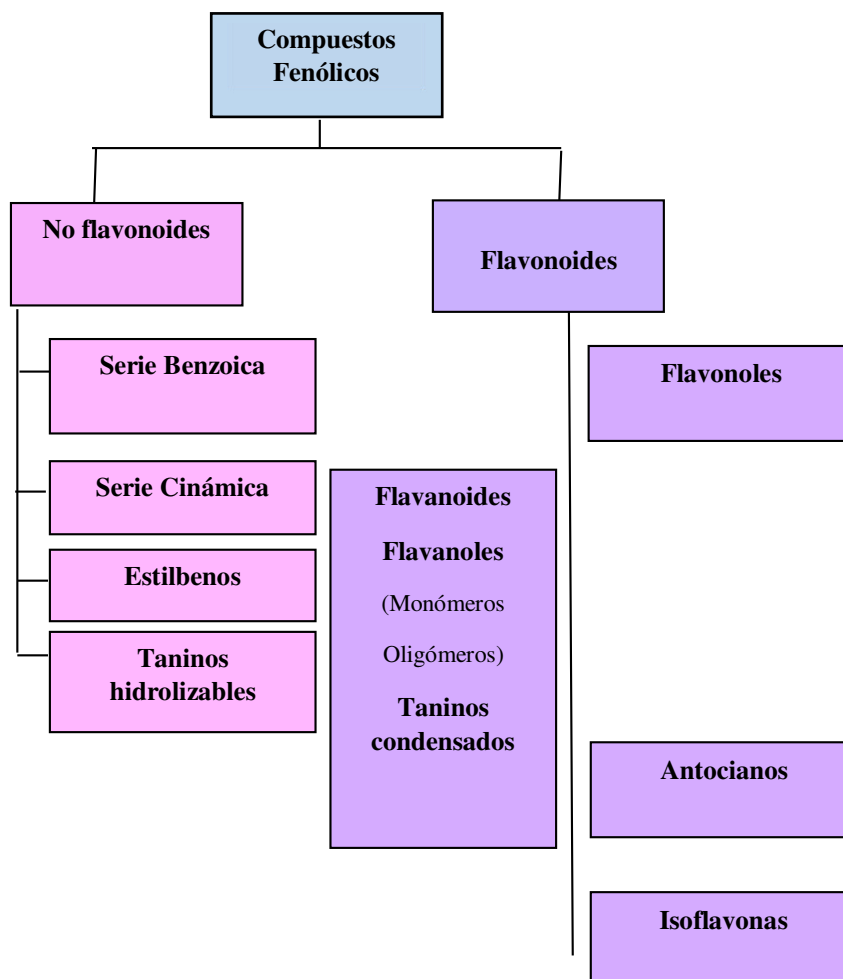


Figura 4. Clasificación de los compuestos fenólicos.
Fuente. García, 2005 citado por Costa, 2008

- b. **Ácido ascórbico.** Es una vitamina hidrosoluble derivada del metabolismo de la glucosa. Protege al organismo del daño causado por los radicales libres. (Valdés, 2006)

La vitamina C es el antioxidante más abundante de la piel y funciona en el compartimento acuoso de la célula; trabajando en combinación con otros antioxidantes, para controlar los radicales libres y proteger la piel del daño ocasionado por ellos. (Farris, *et al.*, 2009)

2.2.5. *La piel y el fotoenvejecimiento*

La piel es un órgano complejo que realiza diversas funciones resultantes de reacciones químicas y físicas, entre las que se encuentran: 1) el servir como barrera entre el medio interno y externo, 2) como órgano de percepción, termorregulación, evaporación, 3) absorción de sustancias (intercelular y transcelular), almacén de grasa, 4) excreción por glándulas sudoríparas (perspiración), y secreción de sebo (Castrillón, Palma y Padilla, 2008)

El envejecimiento es un proceso debido a factores intrínsecos y extrínsecos. El envejecimiento intrínseco es consecuencia natural de los cambios fisiológicos propios de la edad. El envejecimiento extrínseco se produce por factores externos determinantes tales como la exposición a la luz del sol, la contaminación o la nicotina, movimientos repetitivos del músculo como entrecerrar los ojos o fruncir el ceño, y componentes misceláneos del estilo de vida (Farage, Milller, Elsner y Maibach, 2008)

El fotoenvejecimiento produce una piel seca, escamosa, adelgazada, casi transparente, en algunos pacientes deja ver los vasos sanguíneos. Por esta razón es importante conocer la acción tópica de productos que contrarresten o detengan estas alteraciones producto del fotoenvejecimiento de la piel (Concepción, Fernández y Fernández, 2001)

2.2.6. *Liofilización*

Es un proceso utilizado para conservar material biológico, eliminando el agua de una muestra; lo que implica congelar primero la muestra y luego secarla, bajo vacío, a temperaturas muy bajas. El proceso de liofilización es en realidad una aplicación de un fenómeno físico llamado sublimación: la transición de una sustancia desde un estado sólido a un estado gaseoso, sin pasar primero por la fase líquida.

Durante la liofilización, el agua en la muestra congelada se elimina como vapor de agua, sin primero descongelar la muestra. (Phillips, 2016)

La liofilización requiere una muestra congelada. Si el punto de congelación de la muestra se suprime por la presencia de disolventes, los disolventes deben eliminarse con una concentración de vacío antes de la liofilización para que la muestra pueda congelarse entonces sólida. (Williams, 2016)

CAPITULO III: METODOLOGÍA

1.1. Materiales, equipos y otros

3.1.1 *Material biológico*

a) *Muestra vegetal.* Tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua), provenientes del departamento de Ancash.

b) *Animales de experimentación.* Ratones machos albinos (*Mus musculus*), cepa swiss, con un peso promedio de 24 ± 2 g, provenientes del Instituto Nacional de Salud y acondicionados en el bioterio del laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con agua y alimento a voluntad, ciclo luz – día de 12 horas y temperatura de 22 a 26 °C. (Lima, Perú)

3.1.2 *Materiales y equipos de laboratorio*

- ✓ Materiales de vidrio diverso
- ✓ Balanza analítica OHAUS (precisión: 0.01 g)
- ✓ Balanza METLER TOLEDO (precisión: 0.1 g)
- ✓ Agitador Hélice IKA
- ✓ Liofilizador marca LABCONCO, modelo FREEZONE 12
- ✓ Lámpara CAMAG (onda corta)
- ✓ Espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific
- ✓ Balanza analítica 0.0001 g – 100.0000 g OHAUS
- ✓ Vórtex
- ✓ Viscosímetro Brookfield LVD
- ✓ Refrigerador LG
- ✓ Potenciómetro METLER TOLEDO
- ✓ Estufa termostática IMULSA
- ✓ Microscopio Leica DM750 con cámara

3.1.3 *Reactivos, drogas y otros*

- ✓ Reactivo Folin Ciocalteu Sigma
- ✓ Reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil Sigma
- ✓ Carbonato de sodio Merck
- ✓ Ácido tricloroacético Merck
- ✓ Estándar ácido gálico Sigma-Aldrich
- ✓ Estándar ácido ascórbico Sigma-Aldrich
- ✓ Metanol grado analítico Merck
- ✓ Formol al 10%
- ✓ Agua destilada
- ✓ Pentobarbital sódico (Halatal 6.5 g/100 mL)
- ✓ Hoja de bisturí
- ✓ Jeringas de tuberculina
- ✓ Insumos para la crema con extracto: Agua, propilenglicol, PEG-100 estearato & estearato de glicerilo, palmitato de isopropilo, ácido esteárico, alcohol cetosteárico, ciclometicona, glicerina, triglicéridos caprílico/ caprico, hidroxil etil acrilato/sodio acrilodimetil taurato copolimero & escualeno & polisorbato 60, isododecano & dimeticona/bis-isobutil PPG-20 cospolimero, dióxido de titanio, trietanolamina, fenoxietanol & caprilil glicol.
- ✓ Potes polietileno blanco x 100 g
- ✓ Crema depilatoria VEET
- ✓ Producto de referencia: crema cosmética con extracto de noni, acai y acerola. (Zapaille, 2013)

3.2 Flujo de la investigación

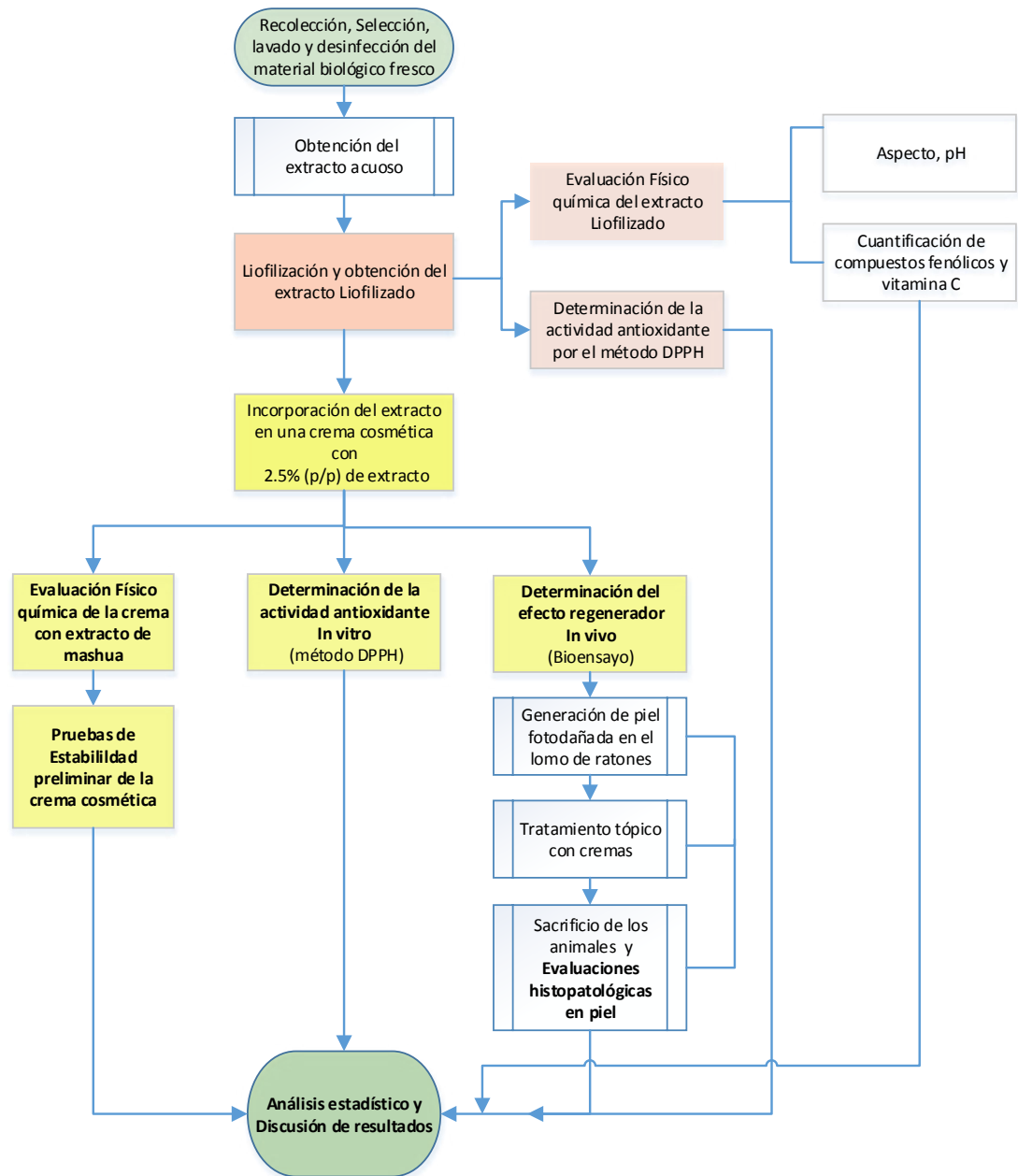


Figura 5. Flujo de la Investigación
Fuente. Propia

3.3 Métodos

Se siguió la metodología detallada en la figura 5.

3.3.1 *Recolección, identificación del material botánico*

Los tubérculos de mashua fueron recolectados en la provincia de Aija, departamento de Ancash, en el mes de abril del 2014, y la identificación la realizó el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Anexo 1)

3.3.2 *Elaboración del extracto de mashua*

- a) Selección y clasificación de los tubérculos, los que se encontraban en mejor estado se les cortó la colilla.
- b) Lavado y desinfección: aproximadamente 5 kg de tubérculos fueron lavados, utilizando agua potable circulante; luego se desinfectaron colocándolos por 30 minutos en agua destilada con hipoclorito de sodio al 4,9% (5 gotas por litro de agua).
- c) Fraccionamiento: los tubérculos fueron cortados en finas rodajas de aproximadamente 2 mm de espesor.
- d) Adición del agente encapsulante: una solución acuosa de dextrina al 1,5 % fue añadida a las rodajas de tubérculos del paso anterior en la proporción de 100 mL por cada kg de mashua. (Sotomayor, 2000)
- e) Pulpeado: se licuaron las rodajas de tubérculo con la solución de dextrina en una licuadora hasta obtener un preparado con partículas pequeñas de pulpa.
- f) Filtración: se realizaron 2 filtraciones, la primera con ayuda de malla organdí y la segunda, utilizando papel filtro. La solución obtenida se colocó en un frasco pírex con tapa x 1 L.
- g) Liofilización: el preparado se colocó previamente en el congelador a una temperatura de -70 °C por 12 horas. Luego se colocó en la liofilizadora a temperatura de -40 °C, y presión de 133×10^{-3} mmHg, por 72 horas hasta que toda el agua fue consumida.



Figura 6. Flujograma de la obtención del extracto liofilizado
Fuente. Propia

Una vez obtenido el extracto liofilizado, se realizó el análisis fisicoquímico del mismo, luego del cual se establecieron las especificaciones de calidad con la elaboración de un protocolo de análisis del extracto. (Anexo 2):

- a) Aspecto: por observación directa.
- b) pH (técnica propia): el extracto fue dispersado en agua purificada y se midió el pH en el potenciómetro temperatura de 25 °C.
- c) Dispersabilidad: se emplearon diferentes vehículos (agua purificada, alcohol 96° y propilenglicol) para dispersar el extracto liofilizado en polvo. Para esta prueba se colocó aproximadamente 0,5 g de extracto en un tubo de ensayo, se añadió el solvente y se agitó por 1 minuto.

3.3.3 Formulación de la crema cosmética con el extracto

Se diseñó una emulsión agua en aceite, a la que se incorporó el extracto liofilizado. (Figura 7)

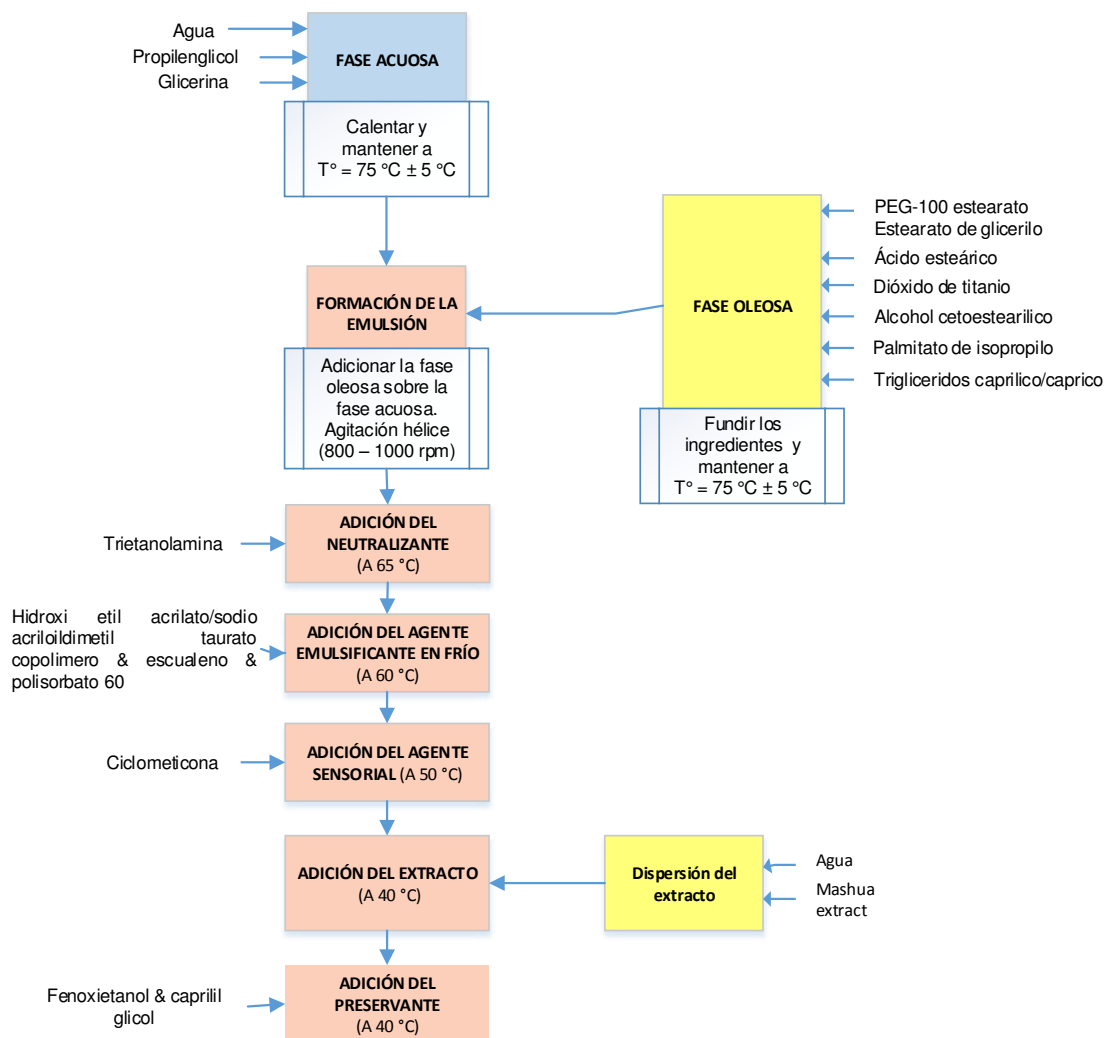


Figura 7. Flujograma de la fabricación de la crema con extracto
Fuente. Propia

Para la obtención de una fórmula robusta, se sometió el preparado a pruebas de estabilidad preliminar como el estrés cíclico, sometiendo la crema con extracto de mashua, a cambios bruscos de temperatura ($45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y de 2 °C a 8 °C) cada 3 días durante 15 días. Al finalizar, se analizó la crema, comparándola con una contramuestra ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $60\% \pm 5\% \text{H.R.}$). Para el análisis se consideró evaluar los cambios en el aspecto, pH, peso específico y viscosidad de la crema.

Una vez obtenida la crema con extracto liofilizado de mashua, con los atributos de calidad sugeridos, se definieron las especificaciones de calidad fisicoquímica y microbiológica del producto, para lo cual se elaboró un protocolo de calidad de la crema elaborada. (Anexo 3)

Los ensayos fisicoquímicos realizados fueron:

- a) Aspecto: se colocó 1g de crema en una placa petri, extendiéndola con ayuda de una espátula y se observó: aspecto, color y olor.
- b) pH: la crema fue dispersada en agua purificada y se realizó la medición a una temperatura de 25 °C.
- c) Peso específico: se realizó a temperatura de 25 °C; se colocó una muestra de crema en el picnómetro de cremas y se registró el peso. Previamente se pesó el picnómetro vacío y con agua destilada. Se obtuvo el resultado, utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Peso específico} = \frac{W_{\text{picnómetro con crema}} - W_{\text{picnómetro vacío}}}{W_{\text{picnómetro con agua}} - W_{\text{picnómetro vacío}}}$$

- d) Viscosidad: se realizó considerando las siguientes condiciones:
 - Viscosímetro: Brookfield modelo LVD
 - Aguja N° 64
 - Velocidad: 5 rpm
 - Temperatura. 25 °C ± 1 °C
 - Cantidad de muestra. 250 mL
 - Tiempo: 3 minutos
- e) Análisis microbiológico: fue realizado por el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La técnica utilizada fue según la USP 38. (Anexo 4)

Para el análisis microbiológico se consideró las siguientes pruebas:

- Recuento total de microorganismos aerobios
- Ausencia de patógenos (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*)

3.3.4 *Cuantificación de los compuestos fenólicos totales*

La determinación de compuestos fenólicos totales, para el extracto y crema se llevó a cabo utilizando el método utilizado por Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventos (1999).

Procedimiento

Se diluyó 10 g del extracto liofilizado de mashua en 100 mL de agua destilada.

En un tubo de ensayo se colocó 1,0 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, 0,02 mL de muestra y se dejó en reposo durante 5 minutos, luego de los cuales se agregó 0,95 mL de solución de carbonato de sodio al 7,5%, se completó a 3 mL con agua destilada; luego se llevó a baño maría a 50 °C durante 10 minutos. Posteriormente se leyó en espectrofotómetro a 760 nm. Se trabajó por triplicado, usando un blanco que no tenía muestra.

Para elaborar la curva de calibración (Figura 8) se consideró como estándar ácido gálico a concentraciones de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ppm ($\mu\text{g/mL}$) a partir de una matriz de ácido gálico 25 ppm. Se realizó el procedimiento anterior para cada concentración.

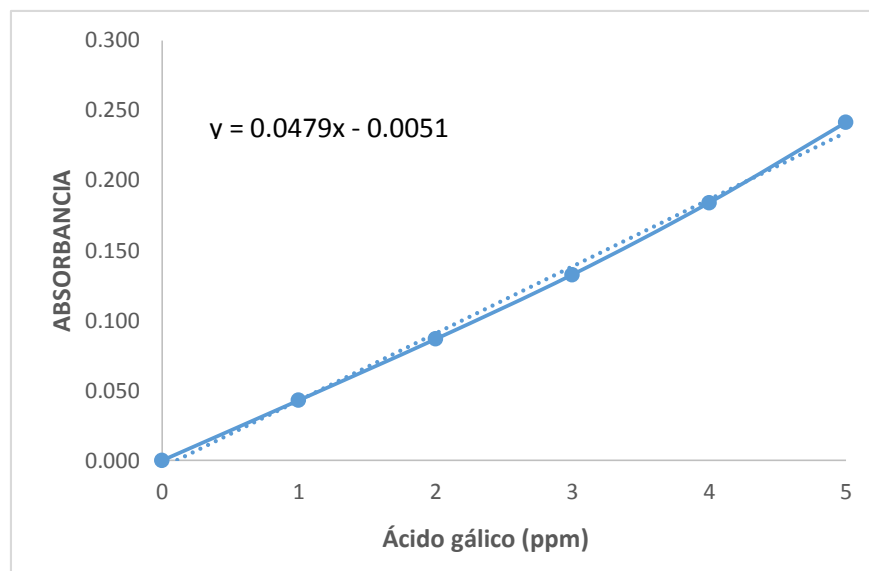


Figura 8. Curva de calibración del ácido gálico (ppm)

3.3.5 Cuantificación de vitamina C

Se llevó a cabo por el método utilizado por Oliveira (2014).

Procedimiento

Se diluyó 10 g del extracto liofilizado de mashua en 100 mL de agua destilada.

Se midió 0,2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10%, luego se añadió 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se agitó para homogenizar. Posteriormente, se añadió 0,02 mL de muestra, se completó a 3 mL con agua destilada; se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a 760 nm. Se trabajó por triplicado, usando un blanco que no tenía muestra.

Para elaborar la curva de calibración (Figura 9) se consideró como estándar ácido ascórbico a concentraciones de 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 y 50,0 ppm ($\mu\text{g/mL}$) a partir de una matriz de ácido ascórbico 100 ppm. Se realizó el procedimiento anterior para cada concentración.

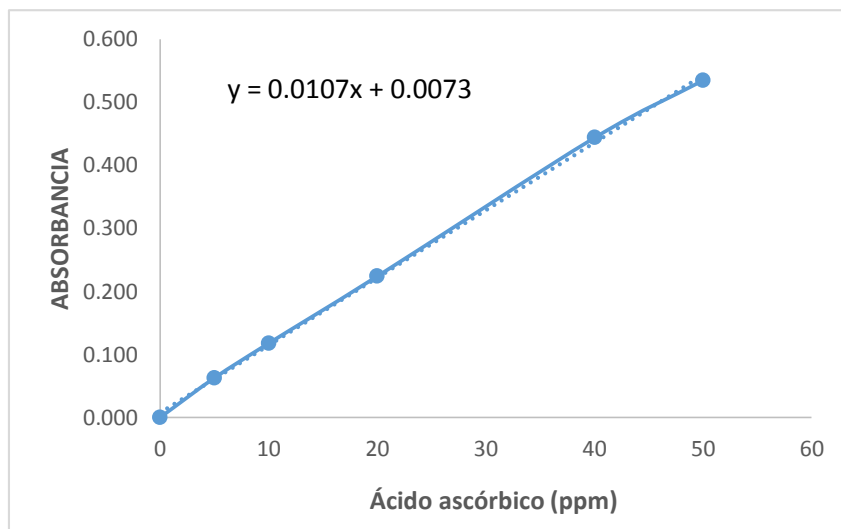


Figura 9. Curva de calibración del ácido ascórbico (ppm)

3.3.6 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante mediante el método espectrofotométrico, utilizando el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). (Muedas, La Rosa y Robles, 2008)

Procedimiento

Se diluyeron 10 gramos de extracto liofilizado en 100 mL de agua destilada, se tomaron 10 mL de la solución anterior y diluyeron en 100 mL de agua destilada.

Para la determinación de la capacidad antioxidante del extracto de mashua, se utilizaron volúmenes de muestra comprendidos entre 0,03 y 0,15 mL a los cuales se añadió 1,0 mL de metanol y 1,0 mL de solución del radical libre estable DPPH* 0,1 mM, completando un volumen total de 3 mL en cada tubo con metanol. Luego se dejó en reposo en la oscuridad durante 30 minutos, a cuyo término se leyó en el espectrofotómetro a 517 nm. Los resultados se expresan como IC₅₀ (µg/mL). Paralelamente se preparó un tubo blanco para calibrar el equipo (metanol: agua 2:1), y un tubo control que no contenía muestra.

Luego se realizaron los cálculos para expresar los resultados como Capacidad Antioxidante Equivalentes mg vitamina C (VEAC)/ g extracto liofilizado; con una curva de calibración (Figura 10) elaborada con estándar de ácido ascórbico a concentraciones de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ppm ($\mu\text{g/mL}$) a partir de una matriz de ácido ascórbico 20 ppm. Se realizó el procedimiento anterior para cada concentración.

En el caso de la crema, se dispersaron 10 g de muestra en 100 mL de agua destilada; se tomaron 2 mL de la dispersión anterior y se diluye en 10 mL de agua destilada.

La determinación de la capacidad antioxidante de la crema se realizó utilizando el método y la curva de calibración anteriormente descritos.

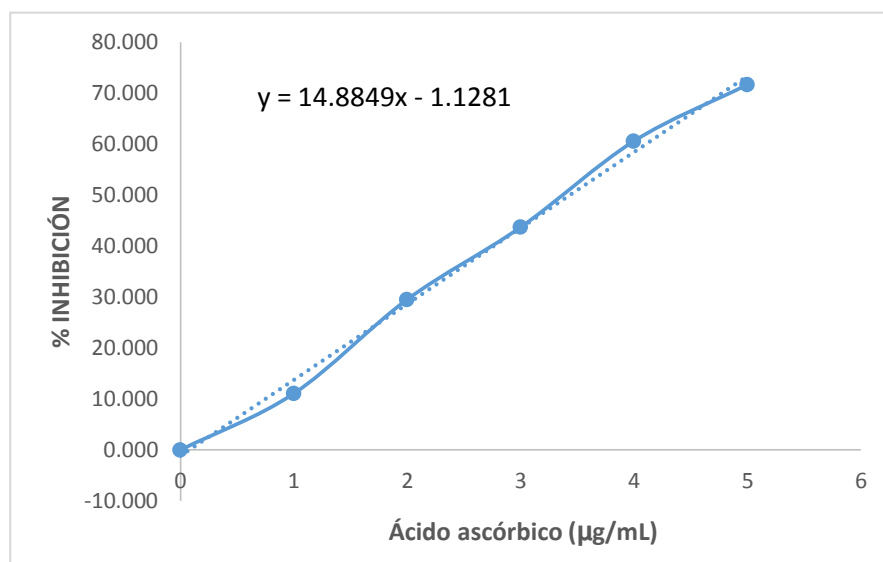


Figura 10 Curva de calibración del % de inhibición del ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$) frente al radical DPPH

3.3.7 *Determinación del efecto regenerador in vivo*

Método operatorio

- ✓ Se distribuyeron los animales de experimentación aleatoriamente en cinco grupos de ocho animales cada uno.

Grupo I: ratones con lomo depilado

(Blanco)

Grupo II: ratones con lomo depilado e irradiado

(Control negativo)

Grupo III: ratones con lomo depilado e irradiado y tratamiento con crema cosmética con extracto de noni, acaí y acerola y con propiedades antioxidantes.

(Control positivo)

Grupo IV: ratones con lomo depilado e irradiado y tratamiento con crema sin extracto

(Placebo)

Grupo V: ratones con lomo depilado e irradiado y tratamiento con crema con extracto liofilizado de mashua

(2,5% p/p)

- ✓ El lomo de los animales fue depilado con crema depilatoria marca VEET y dejado en reposo por 24 horas. Luego se les sometió a radiación UVC, por un intervalo de tiempo de 30 minutos, a una distancia de 30cm. (Hollands, Gómez-Berry y Miyares, 2003)

- ✓ La radiación estimada recibida por los ratones fue de $1,3 \text{ mW/cm}^2$ para una dosis única.
- ✓ Los animales recibieron tratamiento, de acuerdo al grupo al cual pertenecían, durante 7 días, dos veces al día, con intervalos de reposo de 12 horas. La aplicación de la crema con propiedades antioxidantes (producto de referencia), crema sin extracto (placebo) o crema con extracto liofilizado de mashua se realizó sobre la región depilada e irradiada del lomo del ratón. Para la aplicación de la crema, se delimitó un área circular con un diámetro de 2,0 cm en el lomo depilado del ratón y se aplicó 0,05 mL de producto, empleando una jeringa de tuberculina para medir esta cantidad de muestra. (Figura 11)

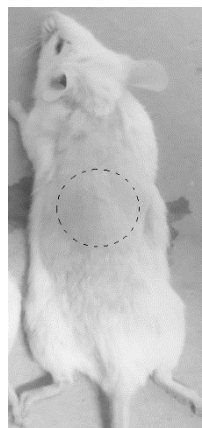


Figura 11. Área de aplicación de la crema en el lomo depilado del ratón.

- ✓ Luego del tratamiento, los animales fueron sacrificados y los cortes de la piel del lomo de estos, se conservaron en formol al 10% y se evaluaron histológicamente, coloreándolas con H-E (Hematoxilina-Eosina) para ser observadas por microscopía óptica. La evaluación de los cortes histológicos se realizaron en base a dos dimensiones:
 1. El estado de la piel
 2. Nivel de inflamación de la piel.

- ✓ Debido a que los datos obtenidos para medir el estado de la piel fueron cualitativos, se consideró dar valores para cada una de las capas de la piel, tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Valores asignados para la evaluación del estado de la piel por capa.

Capa de la piel	Estado	Valor
Capa cornea	Ausente	0
	Discreta	1
	Presente	2
	Conservada o normal	3
Membrana basal	Ausente	0
	Presente	1
	Conservada o normal	2
Epidermis	Ausente	0
	Dañada	1
	Delgada (adelgazada)	2
	Conservada o normal	3
Dermis	Ausente	0
	Dañada	1
	Delgada (adelgazada)	2
	Conservada o normal	3
Tejido laxo	Ausente	0
	Presente	1
Tejido compacto	Ausente	0
	Presente	1

Fuente: Propia.

- ✓ Una vez obtenido los valores para cada capa de la piel, se procedió a realizar una sumatoria de los mismos, obteniéndose un puntaje final, el cual se evaluó considerando los rangos de valores según los estados: bueno, regular y dañada, como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Valores asignados según el estado de la piel.

Estado de la piel	Rango de Valores
Buena	Mayor a 8
Regular	De 4 a 7
Dañada	De 0 a 3

Fuente: Propia.

- ✓ Para medir el nivel de inflamación de la piel, se consideraron dos indicadores: número de macrófagos infiltrados en el tejido y tamaño del edema. Debido a que los datos obtenidos fueron cualitativos, se consideró dar valores tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de los indicadores de inflamación considerados para la evaluación del nivel de inflamación de la piel.

Indicadores		Valor
Número de macrófagos	Menor a 20	0
	20 - 40	1
	40 - 100	2
	Mayor a 100	3
Tamaño del edema	Ausente	0
	Presente (+): pequeño	1
	Presente (++) : mediano	2
	Presente (+++) : grande	3

Fuente: Propia

- ✓ Con los valores obtenidos para cada indicador, se procedió a realizar una sumatoria de los mismos, obteniéndose un puntaje final, el cual se evaluó considerando los rangos de valores según los estados: Sin inflamación, inflamación leve, inflamación moderada e inflamación severa, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Valores asignados según el nivel de inflamación.

Nivel de Inflamación	Rango de valores
Sin inflamación	0
Inflamación leve	[1 - 2]
Inflamación moderada	[3 - 4]
Inflamación severa	[5 - 6]

Fuente: Propia

Finalmente, se determinó el grado de reparación de la piel fotodañada por la acción de la radiación UVC por acción del tratamiento tópico para cada uno de los grupos de animales experimentación, bajo la asesoría y supervisión de un patólogo.

3.3.8 *Análisis estadístico*

Para realizar el análisis estadístico de los resultados sobre el contenido de compuestos fenólicos, vitamina C y actividad antioxidante *in vitro*, se procedió a utilizar las estadísticas descriptivas de promedios y desviación estándar (Anexo 5).

Respecto a los resultados obtenidos sobre el estado de la piel para comprobación del efecto regenerador de la crema cosmética preparada con extracto liofilizado de mashua, se comprobó previamente si tenían distribución normal a través de pruebas de normalidad (Prueba de

Shapiro – Wilk), observándose que todos los resultados presentaban distribución normal a excepción del grupo I (blanco). Luego se realizó la comparación entre los grupos mediante la prueba de Kruskal Wallis, observándose que existen diferencias significativas entre los grupos. Finalmente se compararon por pares de grupos mediante las pruebas de U de Mann Whitney y t de student muestras independientes, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ (Anexo 6).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Análisis organoléptico del extracto liofilizado de mashua.

Tabla 6. Resultados del análisis organoléptico del extracto.

Ensayo	Resultados
Aspecto	Polvo fino, color amarillo, es higroscópico (Figura 12).
pH	6.143
Dispersabilidad	En agua: dispersa fácilmente En alcohol (96°): no se dispersa En propilenglicol: dispersa con dificultad. (Figura 13)



Figura 12. Aspecto del extracto liofilizado de mashua

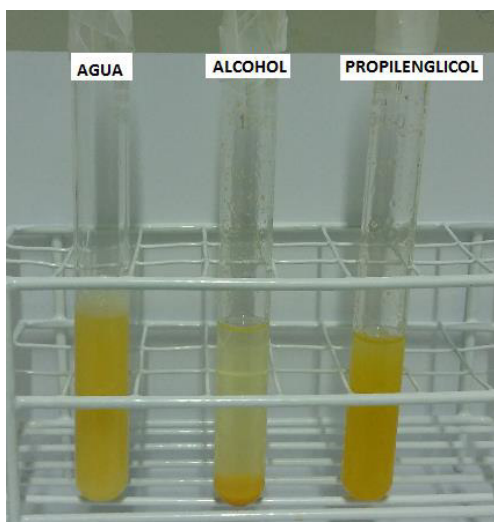


Figura 13. Dispersabilidad del extracto liofilizado de mashua.

4.1.2 *Análisis organoléptico y microbiológico de la crema*

Tabla 7. Resultados del análisis de la crema con extracto de mashua

Ensayos	Resultados
Aspecto	Crema homogénea, color crema, olor característico (Figura 11)
pH	7,01
Peso específico	1,0071
Viscosidad	1158 cps. (Torque 96,2 %)
Recuento de microorganismos aerobios	Menor a 10 UFC/g
Patógenos	
<i>E. coli</i>	Ausencia en 1g
<i>P. aeruginosa</i>	Ausencia en 1g
<i>S. aureus</i>	Ausencia en 1g



Figura 14. Aspecto de la crema con extracto liofilizado de mashua.

4.1.3 Prueba de estabilidad preliminar: estrés cíclico de la crema

Tabla 8. Resultados del análisis de la crema sometida a estrés cíclico.

Ensayo	Resultado
Aspecto	Emulsión homogénea, color crema, olor característico.
pH	6,74
Peso específico	1,0028
Viscosidad	1021 cps. (Torque 81,7 %)

4.1.4 Contenido de compuestos fenólicos totales

Tabla 9. Contenido de compuestos fenólicos totales del extracto

Compuestos fenólicos totales	mg AG / g extracto liofilizado	mg AG / 100 g tubérculos frescos (*)
	12,128	87,227

(*) El valor de compuestos fenólicos tomando como referencia los tubérculos frescos fue calculado en base al rendimiento para la obtención del extracto liofilizado de mashua (Anexo 8).

4.1.5 Contenido de vitamina C

Tabla 10. Contenido de vitamina C del extracto

Contenido de vitamina C	mg AA. / g extracto liofilizado	mg A.A. / 100 g tubérculos frescos (*)
	5,93	42,649

(*) El valor de vitamina C tomando como referencia los tubérculos frescos fue calculado en base al rendimiento para la obtención del extracto liofilizado (Anexo 8).

4.1.6 Actividad antioxidante *in vitro* del extracto y de la crema

Tabla 11. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de mashua

Concentración (µg/mL)	Absorbancia corregida promedio	Porcentaje de inhibición	VEAC mg ácido ascórbico/ g extracto
200,00	0,134 ± 0,0015	21,748	8,956
220,00	0,128 ± 0,0025	25,243	
240,00	0,122 ± 0,0032	29,126	
260,00	0,111 ± 0,0010	35,340	
300,00	0,099 ± 0,0036	42,330	
Ecuación de la recta		Y = 0,1352X – 1,8690	
Coeficiente de correlación		0,9801	
Concentración inhibitoria media (IC ₅₀)		383,5152	

VCEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Vitamina C

Tabla 12. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de la crema con extracto

Concentración (ug/mL)	Absorbancia corregida promedio	Porcentaje de inhibición	VEAC mg ácido ascórbico/ g crema
1250.00	0.124 ± 0.0042	27.961	1.865
1500.00	0.105 ± 0.0021	38.641	
1750.00	0.084 ± 0.0020	51.068	
2250.00	0.072 ± 0.0025	58.252	
2500.00	0.047 ± 0.0012	72.816	
Ecuación de la recta		Y = 0.02850X – 2.4795	
Coeficiente de correlación		0.9881	
Concentración inhibitoria media (IC ₅₀)		1841.457	

VCEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Vitamina C

4.1.7 Efecto regenerador *in vivo* de la crema con extracto

Tabla 13. Determinación del efecto regenerador *in vivo*, en base al estado de la piel por cada grupo de ensayo.

GRUPOS	ESTADO DE LA PIEL			Total	P
	DAÑADA	REGULAR	BUENA		
GRUPO 1	0 0,0%	0 0,0%	8 100,0%	8 100,0%	0,00
GRUPO 2	8 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	8 100,0%	
GRUPO 3	0 0,0%	6 75,0%	2 25,0%	8 100,0%	
GRUPO 4	0 0,0%	2 25,0%	6 75,0%	8 100,0%	
GRUPO 5	0 0,0%	0 0,0%	8 100,0%	8 100,0%	
TOTAL	8 20,0%	8 20,0%	24 60,0%	40 100,0%	

Prueba de Chi Cuadrado=60,000, $p < 0,05$

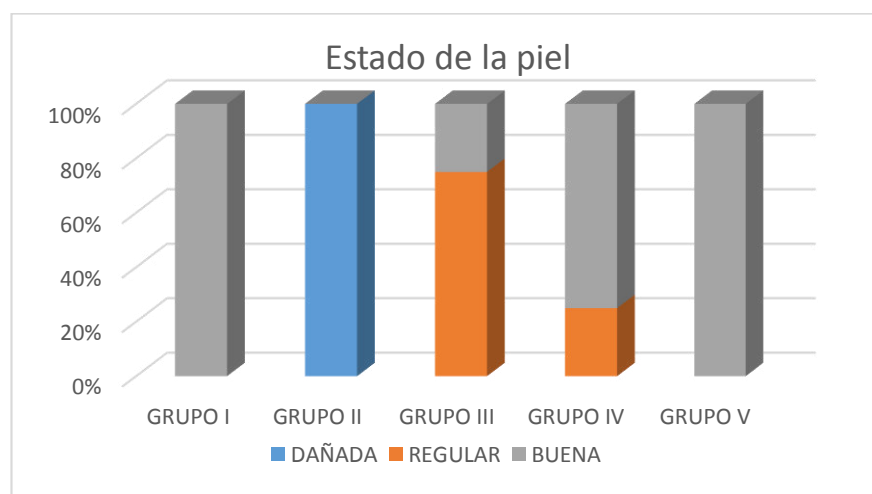


Figura 15. Determinación del efecto regenerador *in vivo*, en base al estado de la piel por cada grupo de ensayo.

Tabla 14. Determinación del efecto regenerador *in vivo*, en base al nivel de inflamación de la piel por cada grupo de ensayo.

Grupos	Inflamación de la piel				Total	P
	Sin inflamación	Inflamación leve	Inflamación moderada	Inflamación severa		
Grupo 1	5 62,5%	3 37,5%	0 0,0%	0 0,0%	8 100,0%	0,000
Grupo 2	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	8 100,0%	8 100,0%	
Grupo 3	0 0,0%	2 25,0%	5 62,5%	1 12,5%	8 100,0%	
Grupo 4	0 0,0%	2 25%	6 75,0%	0 0,0%	8 100,0%	
Grupo 5	0 0,0%	5 62,5%	3 37,5%	0 0,0%	8 100,0%	
Total	5 12,5%	12 30,0%	14 35,0%	9 22,5%	40 100,0%	

Prueba de Chi Cuadrado=63,611; $p < 0,01$

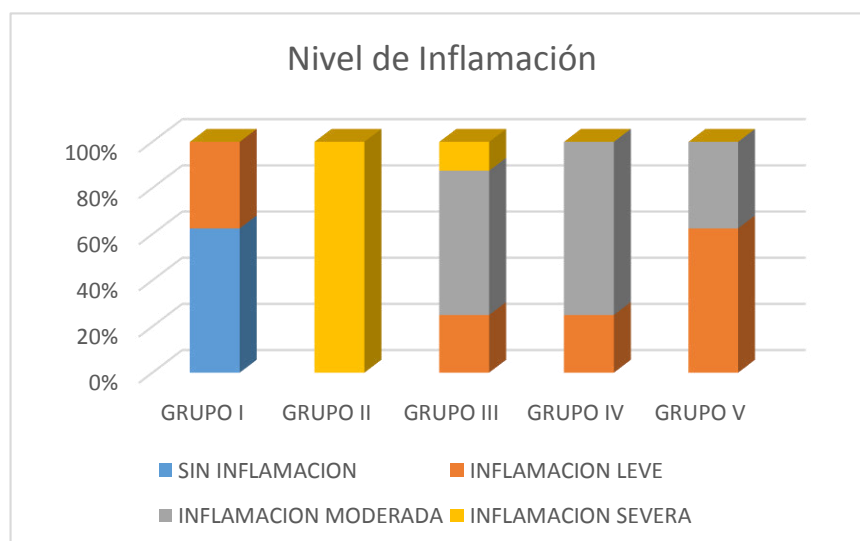


Figura 16. Determinación del efecto regenerador *in vivo*, en base al nivel de inflamación de la piel por cada grupo de ensayo.

4.2 Discusión

La actividad antioxidante del extracto liofilizado de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) y de la crema con el extracto se determinaron utilizando la técnica con el radical libre estable DPPH+. Para este fin, se prepararon soluciones de concentraciones comprendidas en un rango de 200,0 a 300,0 $\mu\text{g/mL}$ de extracto y de 1250,0 a 2500,0 $\mu\text{g/mL}$ de crema; observándose que, a medida que aumenta la concentración, aumenta también la capacidad antioxidante (Tabla 11 y 12), es decir hay una relación directa entre la concentración de la muestra y su actividad antioxidante.

Teniendo en cuenta que un IC₅₀ bajo, está directamente asociado con una actividad antioxidante alta. (Zhu, Lian, Guo, Peng y Zhou, 2011), en otros trabajos se han reportado criterios de selección para los extractos vegetales con base en el IC₅₀; considerando así de alto potencial antioxidante aquellos con valores menores a 30 $\mu\text{g/mL}$ (Ramos, Vizoso, Piloto, García, Rodríguez y Rivero 2003). En el presente estudio el valor de IC₅₀ del extracto fue 383,5152 $\mu\text{g/mL}$, dicho valor no es tan bajo indicándonos un potencial moderado de actividad antioxidante. El valor de IC₅₀ de la crema con extracto de mashua fue 1841,47 $\mu\text{g/mL}$, este valor es mayor al obtenido por Zapaille (2013) quien reporta 20170,0 $\mu\text{g/mL}$ para la crema con extracto de noni, acaí y acerola, utilizada como producto de referencia en el presente estudio.

Por otro lado, el valor de VCEAC obtenido para el extracto fue 64,41 mg / 100 g material fresco (Anexo 8), este valor es menor a los valores reportados para la mora (82,6 mg / 100 g muestra), uva (105,9 mg / 100 g muestra), acaí (108,5 mg / 100 g muestra), guayaba (100,7 mg / 100 g muestra), fresa (132,8 mg / 100 g) y acerola (959,1 mg / 100 g muestra), pero si es mayor a los valores hallados para piña (41,1 mg / 100 g muestra), graviola (57,15 mg / 100 g muestra), maracuyá (46,66 mg / 100 g muestra). (Kuskoski, *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es bastante conocida en relación a su actividad para secuestrar especies reactivas de oxígeno (Pastene, 2009). La actividad antioxidante de un alimento guarda relación directa con su

contenido en compuestos fenólicos. En el presente estudio se determinó que la cantidad de compuestos fenólicos contenidos en el extracto liofilizado de mashua fue de 87,227 mg / 100 g de material fresco en el extracto (Tabla 9); siendo este valor menor a los valores hallados para el mango (307 mg Eq A.G. / 100 g muestra), manzana (232 mg Eq A.G. / 100 g muestra) y granada (219 mg Eq A.G. / 100 g muestra), pero otros como la naranja (70 mg Eq A.G. / 100 g muestra), papaya (62 mg Eq A.G. / 100 g muestra), piña (48 mg Eq A.G. / 100 g muestra) y plátano (43 mg Eq A.G. / 100 g muestra) se encuentran en valores menores a los del tubérculo de mashua (Reddy, CSreeramulu y Raghumath, 2010)

El resultado de compuestos fenólicos obtenido fue de 12,128 mg A.G. / g extracto, este valor es menor al obtenido por Chirinos, *et al* (2007), quien reporta un rango de 14.4 – 18.7 mg A.G. / g extracto seco. Esta diferencia puede ser debida a que los valores de polifenoles pueden verse modificados dependiendo de los métodos utilizados para la extracción como lo señalan en algunas publicaciones (Garzón, 2009). Al parecer el mejor solvente utilizado para la extracción de polifenoles es el metanol, por su polaridad y su capacidad de solubilización para dichos compuestos (Sobhy, Mahsen & Anmar, 2009). Por otro lado, la concentración de polifenoles también va ser afectada por los suelos de donde proceden y de la estación del año en que se producen (Connor, Luby, Tong, Finn y Hancock, 2002).

La mashua presenta un contenido inusual de ácido ascórbico de aproximadamente 77,37 mg A.A. / 100 g tubérculos frescos (Barrera et al, 2004). Sin embargo, en este estudio, se obtuvo un contenido de vitamina C de 42,649 mg Eq AA / 100 g de tubérculos frescos (Tabla 10). Esta diferencia puede ser debida al procesamiento del tubérculo para la obtención del extracto.

Por otro lado, el valor obtenido de ácido ascórbico se encuentra por encima de los encontrados para la oca (38,4), arracacha (27,1), papa blanca (14,0), camote morado (13,6), camote blanco (12,9), olluco (11,5), papa amarilla (9,0) y maca (2,5). Todos expresados en mg/100 g de tubérculos (base húmeda) tal como lo reporta Collazos *et al.* (1993).

Pocorny y Schmidt (2001) mencionan que existe una desventaja de los antioxidantes naturales por su baja resistencia contra el oxígeno, particularmente bajo la exposición a la luz, temperaturas altas y secado.

Según los resultados obtenidos de la prueba *in vivo*, se observa que existe diferencias significativas entre los diferentes grupos de experimentación respecto al estado de la piel. Así se observa que los cortes histológicos provenientes del grupo II (irradiado y sin tratamiento tópico) tienen mayores alteraciones en las capas de la piel (disminución o desaparición del tejido conectivo); en relación a los demás grupos. Además se comprueba que el tratamiento con la crema conteniendo el extracto liofilizado de mashua ayuda a la regeneración de los tejidos de piel en los ratones que habían sido expuestos a la radiación UVC, puesto que no se encuentra diferencias significativas con respecto al grupo I (Tabla 2)

Por otro lado, respecto al nivel de inflamación de la piel de los animales de experimentación, los resultados indican que el grupo V presenta un menor nivel de inflamación en comparación con los demás grupos, observándose que ninguno de los sujetos de estudio presentó inflamación severa y que la mayoría de sujetos presentó inflamación leve (62,5%). Además el porcentaje de sujetos con inflamación moderada es menor en relación a los grupos III y IV (Tabla 14). Considerando estos resultados, podemos afirmar que el tratamiento con la crema que contiene el extracto de mashua ayuda a disminuir el nivel de inflamación de la piel fotodañada debido probablemente a la actividad antioxidante del extracto contenido en la crema, y de esta manera permite que el tejido de piel dañado pueda seguir su proceso de regeneración.

De acuerdo a los resultados obtenidos antes y después de la prueba de estabilidad preliminar (estrés cíclico) al que se sometió la crema con extracto de mashua, se puede afirmar que cumple con los atributos de calidad fisicoquímicos y microbiológicos considerados y, que es probable, que cumpla con la estabilidad a largo plazo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- Se comprobó la actividad antioxidante *in vitro* de la crema con extracto de mashua, obteniéndose un menor valor de IC50 respecto a una crema comercializada en el mercado nacional con actividad antioxidante *in vitro* anteriormente estudiada. Además se comprobó la capacidad antioxidante del extracto liofilizado de mashua, siendo de potencial moderado y relacionado con el contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico.
- Se determinó el contenido de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico obteniéndose valores de 87,227 mg/100 g materia fresca y 42,649 mg Eq AA/100g materia fresca respectivamente. Dichos valores reflejan la actividad antioxidante moderada del extracto.
- Se evidenció el efecto regenerador *in vivo* de la crema cosmética con 2,5 % de extracto liofilizado de mashua, en base al estado y nivel de inflamación de la piel fotodañada después del tratamiento tópico.
- La crema cosmética con extracto liofilizado de mashua cumple con los atributos fisicoquímicos y microbiológicos establecidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrera, V., Espinosa, P., Tapia, C., Monteros, A. y Valverde, F. (2004). Caracterización de las raíces y los tubérculos andinos en la ecoregión andina del Ecuador (Capítulo 1). En: V. Barrera, C. Tapia y A. Monteros (eds.). *Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)*. (p.p. 3 – 30). Quito, Ecuador; Lima, Perú: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación.
- Birbe, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. y Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5(1), 9–19.
doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W., Cisneros-Zevallos, L. (2006). Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*), Oca (*Oxalis tuberosa Molina*) and ulluco (*Ullucus tuberosus Caldas*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1481-1488. doi: 10.1002/jsfa.2529
- Castrillón, L., Palma, A., Padilla, C. (2008) La función inmunológica de la piel. *Dermatología Revista Mexicana*, 52 (5), 211-224. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2008/rmd085b.pdf>
- Chermahini, S., Majid, F., Sarmidi, M. (2011) Antioxidant properties of cashew leaves' extracts before and after treatment with activated carbon used in cosmetics. *Journal of Medicine Plants Research*. 5 (17), 416-427.
Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/264879939>
- Chirinos, R., Campos, D., Arbizu, C., Rogez, H., Rees J.F., Larondelle, Noratto, G. y Cisneros-Zevallos, L.(2007) Effect of genotype maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*) *Journal of the Science of Food Agriculture*, 87(3), 437-446.

- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225. doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005
- Chirinos, R., Campos, D., Warnier, M., Pedreschi, R., Ress, J. F., Larondelle, Y. (2008) Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. *Food Chemistry*, 111(1), 98 – 105. doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.038
- Collazos, C., Philip, W., Viñas, E., Alvistur, J., Urquieta, A., Vasquez, J., Dias, C., *et al.* (1993). Composición de alimentos de mayor consumo en el Perú, Sexta edición; Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Nutrición. Lima – Perú.
- Concepción, A., Fernández, M., Fernández, A. (2001) Evaluación de extractos de algas marinas con actividad antioxidante y reorganizadora de la fibra colágena. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 20 (1), 6-11.
- Connor A. M., Luby J. J., Tong C. B. S., Finn C. E. y Hancock J. F. (2002). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic contents and anthocyanin content among blueberry cultivars. *J Am Soc Hort Sci*. 127(1):89–97.
- Costa, N. (2008) identificación de algunos compuestos fenólicos de la mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) y su contribución a la actividad antioxidante. (Tesis pregrado) UNALM, Lima, Perú.
- Espín S., Villacrés E y Brito B. (2004). Caracterización Físico-Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos. En V. Barrera, et al. (editores). *Raíces y tubérculos andinos, alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador* (p.p. 91-116). Quito, Ecuador; Lima, Perú: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación.
- Farage, M.A., Milller, K.W., Elsner, P., Maibach, H.I. (2008) Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International journal of Cosmetic Science*. 30 (2), 87-95.

- Farris, P. K. y O'Donoghue, M. (2009). Vitamin C Cosmeceuticals. En Z. Draelos, ed., *Cosmeceuticals: Procedures in Cosmetic Dermatology* (pp.94-102). New York, U.S.A.: Saunders Elsevier.
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos*. Vol. 2. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 1280 p.
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wang, Y., Datta, S., *et al.* (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*, 138(11), 1462-1470. doi:10.1001/archderm.138.11.1462
- Garzón, G., Riedl, K. y Schwartz, S. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content and antioxidant activity in Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science: Food Chemistry*, 74 (3), 227 – 232.
- González, C. E. (2009) Efecto protector de extractos de hojas de tres variedades de *Lepidium meyenii* contra el daño ocasionado por la radiación UVB en piel de ratones. (Tesis de maestría) Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
- Grau, A., Ortega, R., Nieto, C., Hernnan, M. (2003) Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). Promoting the conservation and use of under-utilized and neglected crops. Centro Internacional de la papa. (p. 55), Lima, Perú.
- Gutierrez, J. (2006). ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres?. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 37 (4), 69-73. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937409.pdf>
- Hollands, I., Gómez-Berry, H., Miyares, C.M. (2003) Modelo biológico para evaluar la acción fotoprotectora de un extracto de cordón umbilical humano. *Revista Cubana de Farmacia*. 37 (1), 20-26. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000100003

- Humbert, P., Haftek, M., Creidi, P., Lapiere, C., Nusgens, B., Richard, A., *et al.* (2003). Topical ascorbic on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. *Exp Dermatol.* 12(3), 237-244. doi: 10.1034/j.1600-0625.2003.00008.x
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A. M., Mancini-Filho J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(4), Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lim, T. K. (2016). *Tropaeolum tuberosum*. En: T. K. Lim (Ed.), Edible Medicinal and non medicinal plants – Volumen 12 Modified stems, roots, bulbs (p.p. 94-102). Springer. doi: 10.1007/978-3-319-26065
- Magliano, J. (2014) Antioxidantes de uso tópico en dermatología. *Tendencias en Medicina*, 44, 91 – 96. Recuperado de: http://tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes44/art_17.pdf
- Manrique, I., Arbizu, C., Vivanco, F., Gonzales, R., Ramirez, C., Chávez, O., *et al.* (2014) *Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*. Colección de germoplasma de mashua conservada en el centro Internacional de la Papa (CIP). Centro Internacional de la Papa. (p. 122), Lima, Perú
- Mesa-Vanegas, A. Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Trujillo, S., Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13 – 26.
- Muedas, G., La Rosa, A., Robles, J. (2008) Evaluación electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la *Bauhinia guianensis* var. *Kuntiana* Aubl. *Revista de la Sociedad Química Del Perú.* 74(4), 233-246.
- Nackz M, Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Food Chromatogr. A* 1054: 95-111.
- Natarajan, V., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R. y Gokhale, R. (2014). Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chemical Biology.* 10(7), 542-551. doi:10.1038/nchembio.1548

- Oliveira, G. (2014) Capacidad antioxidante de *Averrhoa carambola L.* (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres. (Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Nutrición con mención en Aspectos Biológicos de la Nutrición). Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Oresajo, C., Pinell, S. (2011) Review of photodamage and oxidative stress and protection provided by topical antioxidants. *European Dermatology*, 5(1), 32-35.
- Pastene, E. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (6), 449 -455.
- Pastene, E., Gómez, M., Speisky, H. y Nuñez-Vergara, L. (2009). Un sistema para la detección de antioxidantes volátiles comúnmente emitidos desde especias hierbas medicinales. *Química Nova*, 32 (2), 482 – 487.
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 22 (1), 48-57. Recuperado de: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf
- Perez, M. H. (2005) Evaluación de las características funcionales de diez cultivares de mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*) en seis estados de crecimiento y diferentes periodos de soleado (Tesis pregrado). UNALM, Lima, Perú
- Phillips, T. (2016, 06 de agosto). How Lyophilization Preserves Biological Material. The Balance. Recuperado el 27 de marzo del 2017, de <https://www.thebalance.com/lyophilization-preserving-biological-material-375590>
- Pillai, S., Oresajo, C. y Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation (a review). *Int. J. Cosmet. Sci.* 27(1), 17-34.

- Pocorny, J. y Schmidt, S. (2001). Natural antioxidant functionality during food processing. Wood head publishing limited Cambridge England, Part 4.
- Ramallo, R. (2004) Análisis exploratorio de los ácidos grasos del isaño (*Tropaeolum tuberosum*) Investigación y Desarrollo, 4, 71 – 77.
- Ramos A., Vizoso A., Piloto J., García A., Rodríguez C.A., Rivero R. (2003). Screening and antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*; 87: 241 – 246.
- Reddy, K., Sreeramulu, D. y Raghunath, M. (2010) Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43: 285 - 288
- Rojas-Barquera, D., y Narváez-Cuenca, C. (2009). Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava L.*) cultivadas en Colombia. *Química Nova*, 32 (9), 2336 – 2340.
- Singleton, V., Orthofer, R., y Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of enzymology*, 299 (1), 152-178.
- Sohby, M., Ammar, A. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112, 595 – 598.
- Sotomayor, P.G. (2000) Influencia de los encapsulantes y las temperaturas de secado en la calidad del camu camu (*Myrceria dubia*) liofilizado. (Tesis pregrado) UNALM, Lima, Perú.
- Tapia, M. E., Fries, A. M. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE: Lima.
- Temoche, M., Campos, D., Chirinos, R., Cisneros, L. (2004). Evaluación de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante presente en 30 genotipos de mashua. *Anales Científicos UNALM*, 57, 229-247.

- Valdés, F. (2006) Revisión: Vitamina C. *Actas Dermosifiliogr.* 97(9), 557-568.
- Vásquez, J., Gonzales, J., Pino, J. L. (2012). Disminución en los parámetros espermáticos de ratones tratados con el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* "mashua". *Rev. peru. biol.* 19(1), 89 – 93.
- Williams, K. (2016, 25 de agosto), Lyophilization, evaporation or concentration: Which is best for my samples?, Labconco. Recuperado el 27 de marzo del 2017, de <http://www.labconco.com/news/lyophilization-concentration-or-evaporation-whic>
- Young, I. S. y Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol*, 54(3), 176-186. Recuperado de: <http://jcp.bmj.com/content/jclinpath/54/3/176.full.pdf>
- Zapaille, M. Y. (2013). Diseño y formulación de una crema con actividad antioxidante y humectante a base del fruto del *Corryocactus brevistylus* "Sanky" (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Zhu K-X., Lian C-X., Guo X-N., Peng W., Zhou H-M. (2011). Antioxidant activities total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* 126: 122 - 1126.

ANEXO 1. Constancia de Identificación de los tubérculos de mashua



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 69-USM-2014

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

La muestra vegetal (raíz tuberosa), recibida de la Srta. Q. F. **Rosmery JUNES OLIVERA**, alumna, de la Maestría de Ciencias Farmacéuticas de la **Facultad de Farmacia y Bioquímica** de la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Tropaeolum tuberosum* R. & P.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: GERANIALES

FAMILIA: TROPAEOLACEAE

GENERO: *Tropaeolum*

ESPECIE: *Tropaeolum tuberosum* R. & P.

Nombre vulgar: "**Mashua**"

Determinado por: **Mag. Hámilton Beltrán S.**

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

Lima, 21 de abril del 2014



Haydeé Montoya Terreros
Dra. Haydeé Montoya Terreros
 JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS

ANEXO 2. Protocolo de análisis del extracto liofilizado de mashua

PROTOCOLO DE ANÁLISIS

Nombre: Extracto Liofilizado de Mashua
(*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón*)

Lote:

Fecha fabricación:

ENSAYOS

ESPECIFICACIONES

Aspecto: Polvo fino de color ligeramente amarillo a amarillo, es higroscópico.

Dispersibilidad

- **En agua:** Se dispersa fácilmente.
- **En alcohol:** No se dispersa.
- **En propilenglicol:** Se dispersa con dificultad.

pH (25 °C, dispersión 10 %): 5.00 – 7.00

Compuestos fenólicos totales: No menos de 75 mg AG / 100 g tubérculos

Frescos.

Ácido ascórbico: No menos de 30 mg Eq. AA. / 100 g tubérculos frescos

Condiciones de almacenamiento: Mantener a temperaturas entre -15 °C a 10 °C.

ANEXO 3. Protocolo de análisis de la crema con extracto de mashua

PROTOCOLO DE ANÁLISIS

Nombre: Crema con extracto Liofilizado de Mashua
(2.5 % p/p)

Presentación:

Lote:

Fecha fabricación:

ENSAYOS

ESPECIFICACIONES

Ensayos Organolépticos

Aspecto: Crema homogénea, color crema, olor característico.

pH (25 °C, sol. 10 %): 5.00 – 7.00

Peso específico: 0.9800 – 1.1000

Viscosidad: 800 cps – 1200 cps

Exámen Microbiológico

Recuento Total de Microorganismos aerobios Menor de 5000 UFC / g

Ausencia de patógenos:

Escheridia coli Ausencia en 1 g

Pseudomonas aeruginosa Ausencia en 1 g

Staphylococcus aureus Ausencia en 1 g

Condiciones de almacenamiento: Mantener en lugar fresco y seco (temperatura menor a 30 °C).

ANEXO 4. Análisis microbiológico de la crema con extracto de mashua



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º000113-CPF-2016**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004145/2016
SOLICITADO POR : ROSMERY JUNES OLIVERA
DIRECCIÓN : Jr. Huáscar 359 Dpto. 502 Urb. El Trebol II etapa – Los Olivos
MUESTRA : CREMA CON EXTRACTO LIOFILIZADO DE MASHUA
Nº DE LOTE : 1109995
CANTIDAD : 04 potes x 80g
FECHA DE RECEPCIÓN : 29 de Marzo del 2016
FECHA DE FABRICACION : Octubre del 2015
FECHA DE VENCIMIENTO : Octubre del 2017

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS			
ENSAYO	ESPECIFICACIONES	MÉTODO	RESULTADOS
Recuento Total de Microorganismos Aerobios	<5000 UFC/g	USP 38	<10 UFC/g
----- PATÓGENOS -----			
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1g	USP 38	Ausencia en 1g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 1g	USP 38	Ausencia en 1g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1g	USP 38	Ausencia en 1g

Lima, 19 de Abril del 2016

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



FCCA-009 R1

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú - Telfs.: (511) 6197000 anexo 4814 / 3284737 anexo 14 Fax (511) 2287398 - Ap. Postal 1760 - Lima 1
E-mail: cicotox@unmsm.edu.pe <http://www.unmsm.edu.pe/farmacia>

ANEXO 5. Diagnóstico microscópico por análisis histológico

CERTIFICADO

DIAGNÓSTICO MICROSCOPICO POR ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Se certifica que se ha realizado el diagnóstico histológico de las muestras obtenidas a partir de la piel de ratones según los grupos de trabajo del bioensayo descrito en el modelo experimental.

GRUPO I:

Corte histológico sin alteraciones microscópicas significativas. Presencia de capa cornea, epidermis, membrana basal, dermis con tejidos laxo y compacto normal. Presencia de macrófagos (20 – 40 por campo), con ausencia de edema; indicando reacción inflamatoria leve.

GRUPO II:

Corte histológico con ausencia de capa cornea, epidermis y membrana basal. Presencia de dermis alterada (sin tejidos laxo y compacto). Presencia de macrófagos (mayor a 100 por campo), con presencia de edema (+++), indicando reacción inflamatoria severa.

GRUPO III:

Corte histológico con capa cornea discontinua, quemada y laminada. Presencia de epidermis, membrana basal y dermis con tejidos laxo y compacto. Presencia de macrófagos (20 – 100 por campo) y presencia de edema (++), indicando reacción inflamatoria moderada.

GRUPO IV:

Corte histológico con presencia de capa cornea, epidermis delgada, membrana basal conservada y dermis con tejidos laxo y compacto. Presencia de macrófagos (20 – 40 por campo) en la mayoría de cortes y con presencia de edema (++), indicando reacción inflamatoria leve a moderada.

GRUPO V:

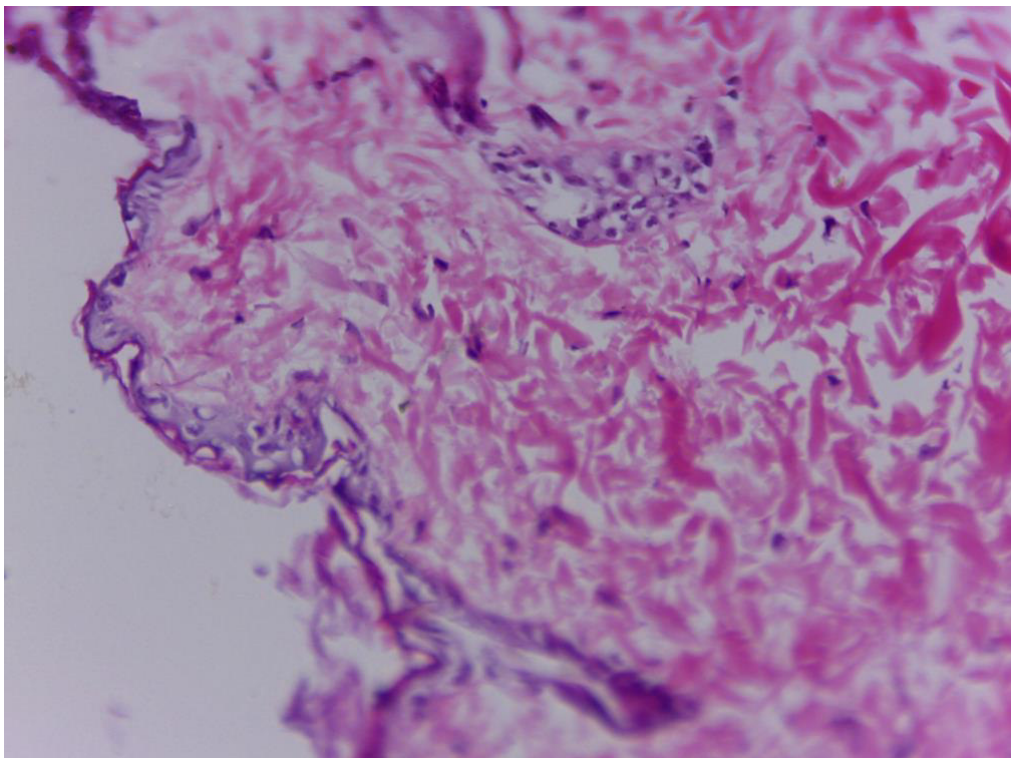
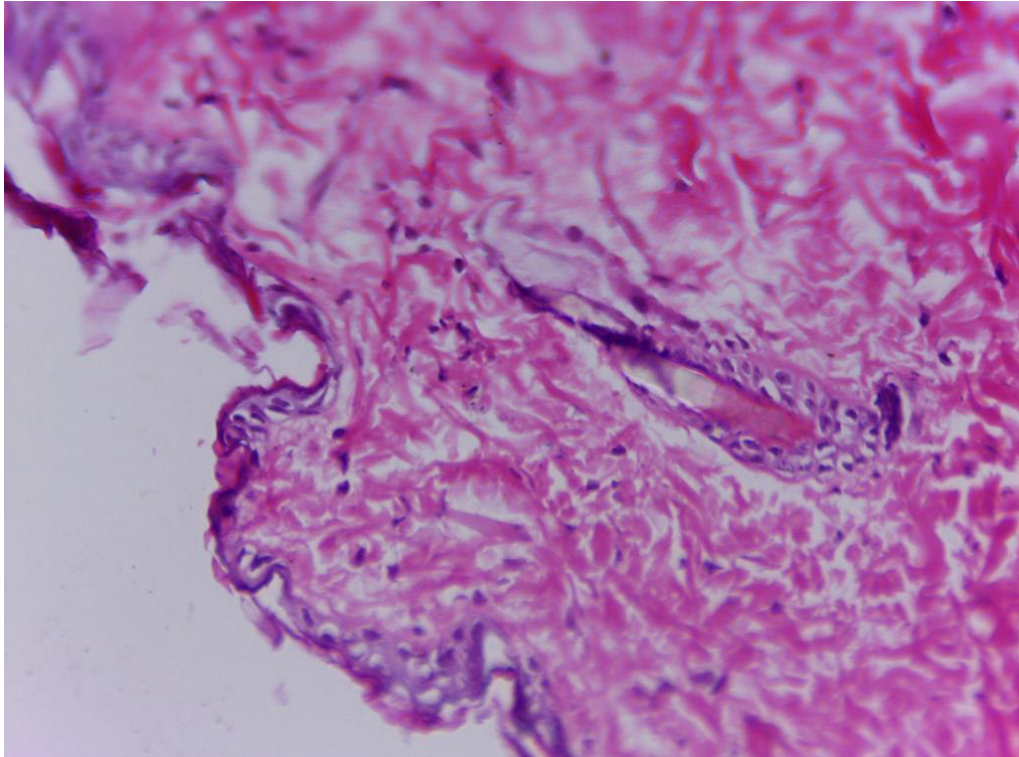
Corte histológico con presencia de capa cornea y epidermis normal y conservada, membrana basal, dermis con tejidos laxo y compacto. Presencia de macrófagos (20 – 40 por campo) en la mayoría de cortes y presencia de edema (+), indicando reacción inflamatoria leve a moderada.

Se adjunta imágenes de los cortes histológicos de las muestras analizadas.


JOSE ERNESTO RÍOS GONZÁLEZ
DOCTOR EN MEDICINA
EMP. 05514 DUT. 14
Nombre y Firma del Patólogo

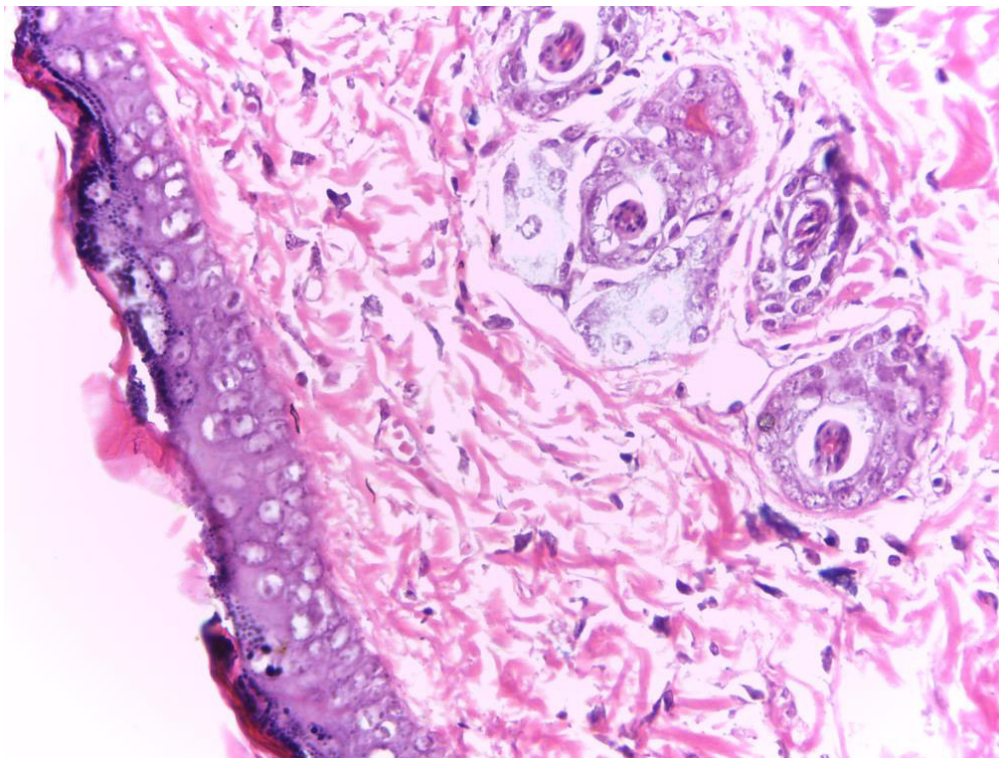
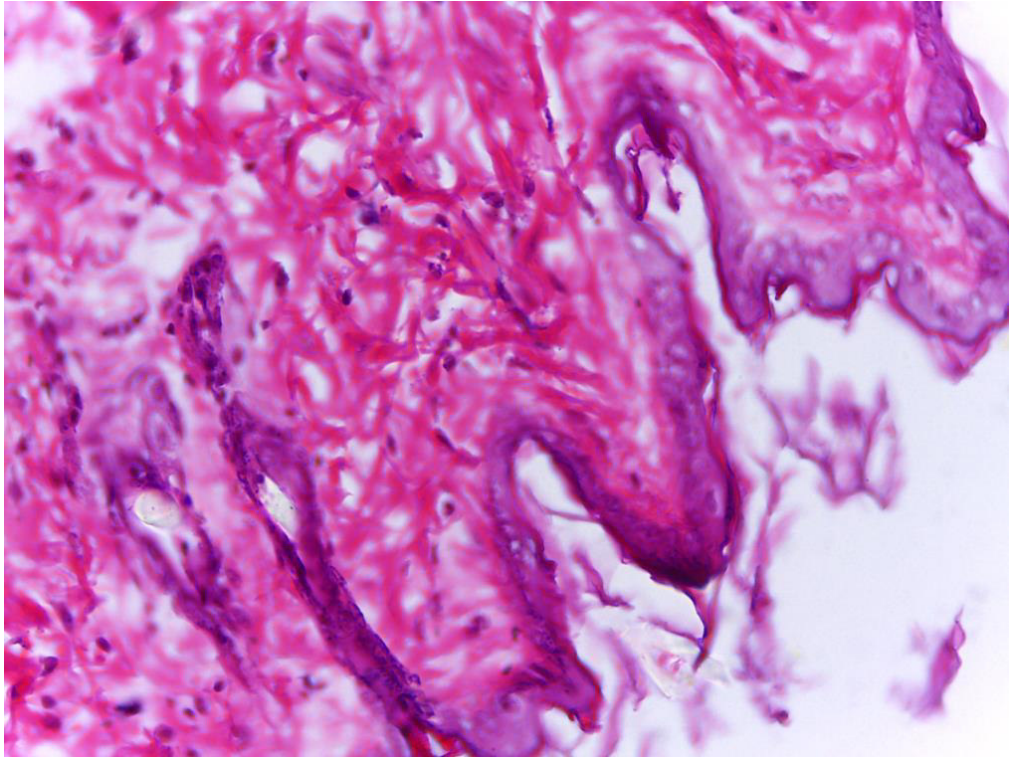
CORTES HISTOLÓGICOS – GRUPO I

(Vistas a 40X)



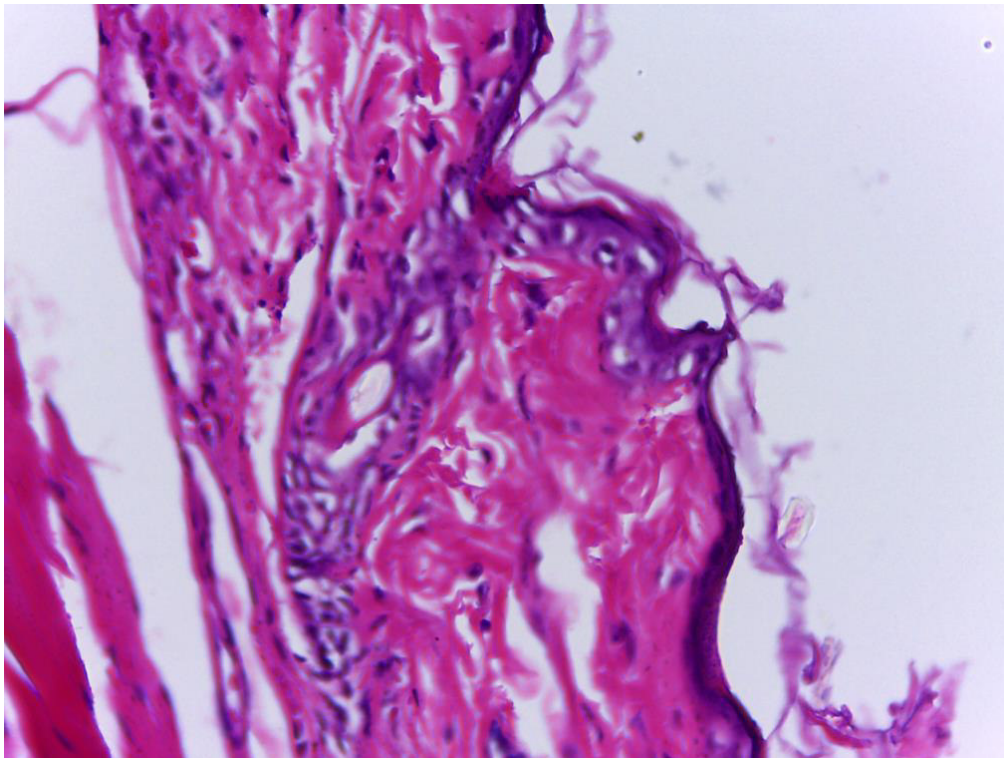
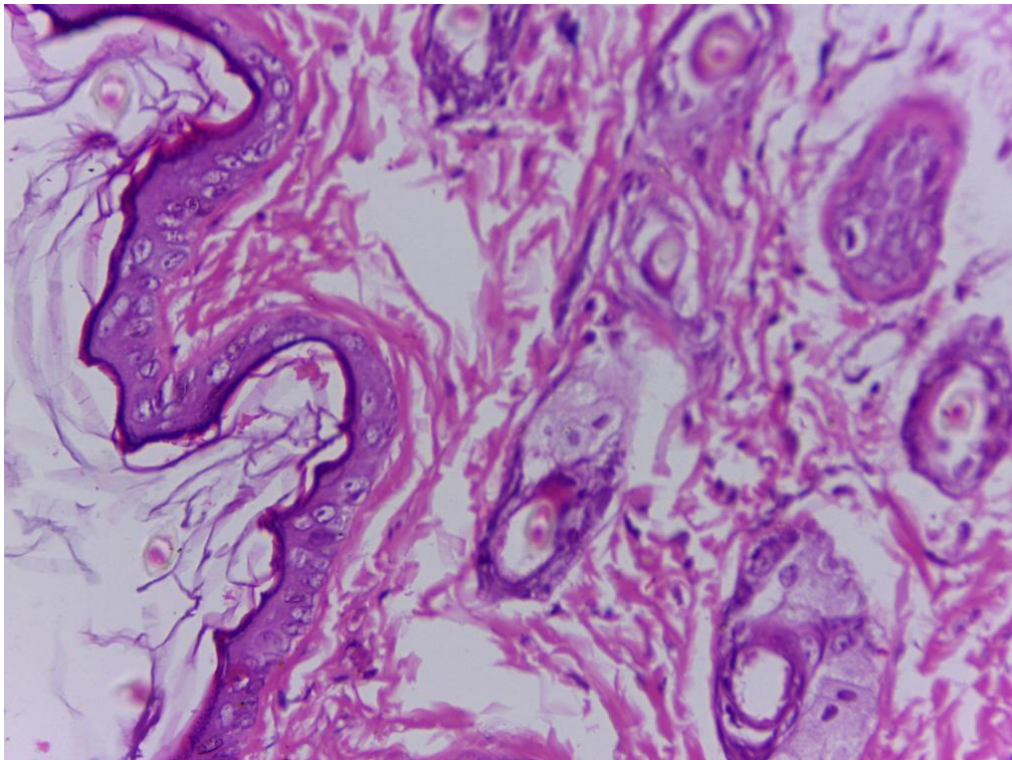
CORTES HISTOLÓGICOS – GRUPO II

(Vistas a 40X)



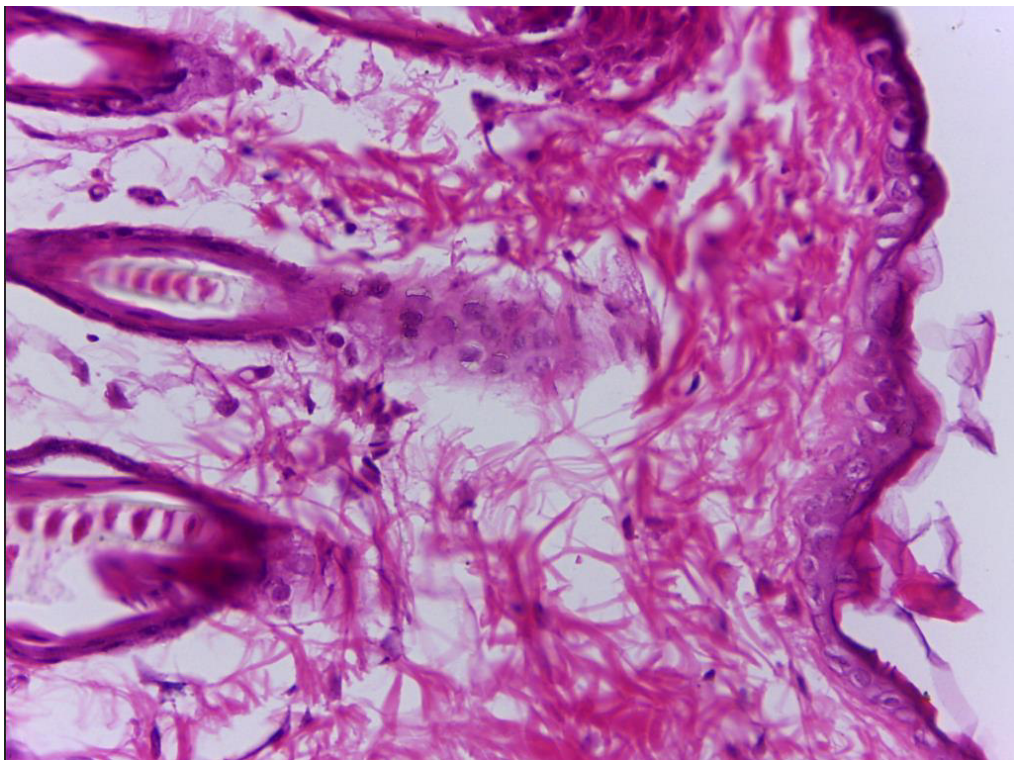
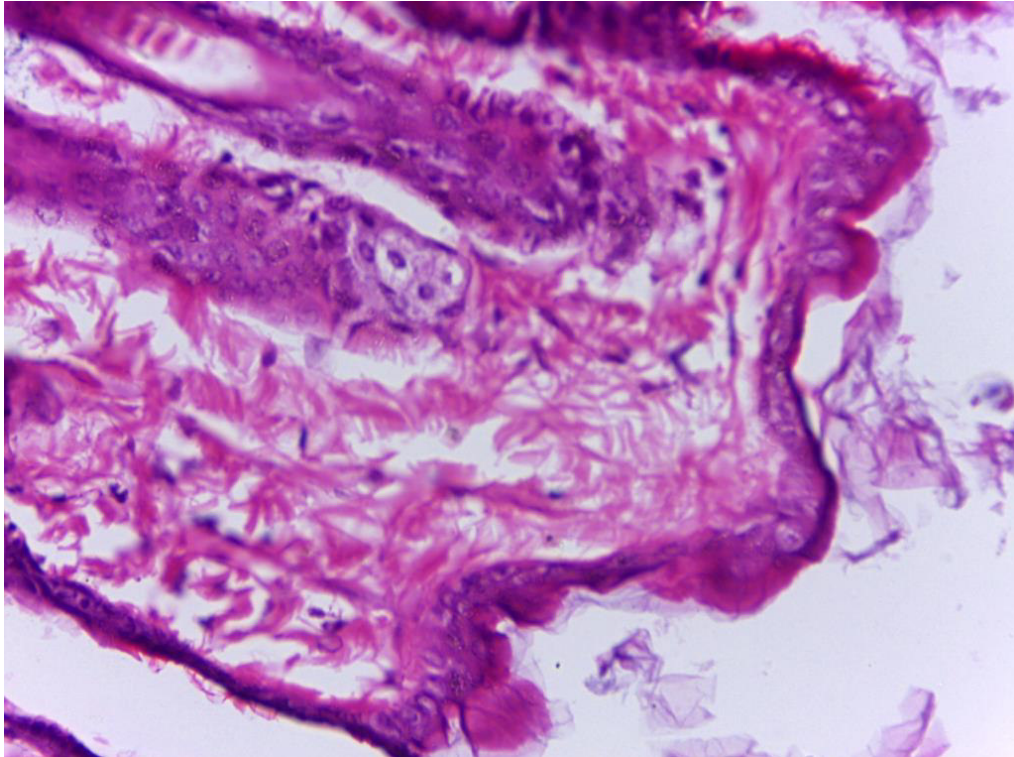
CORTES HISTOLÓGICOS – GRUPO III

(Vistas a 40X)



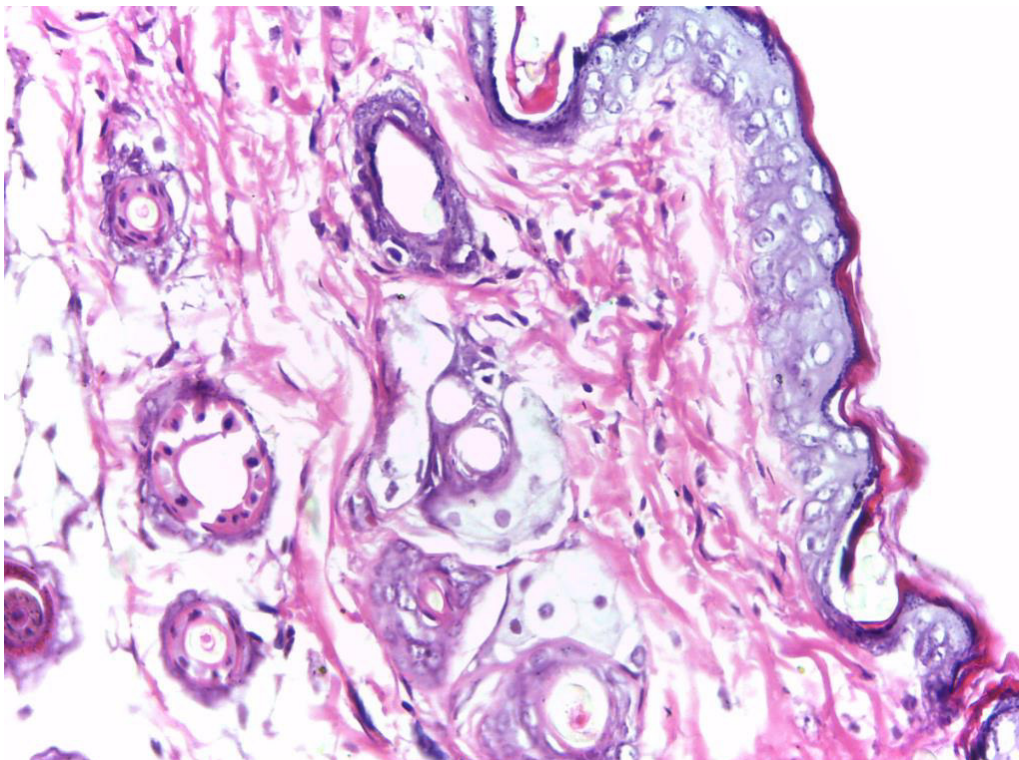
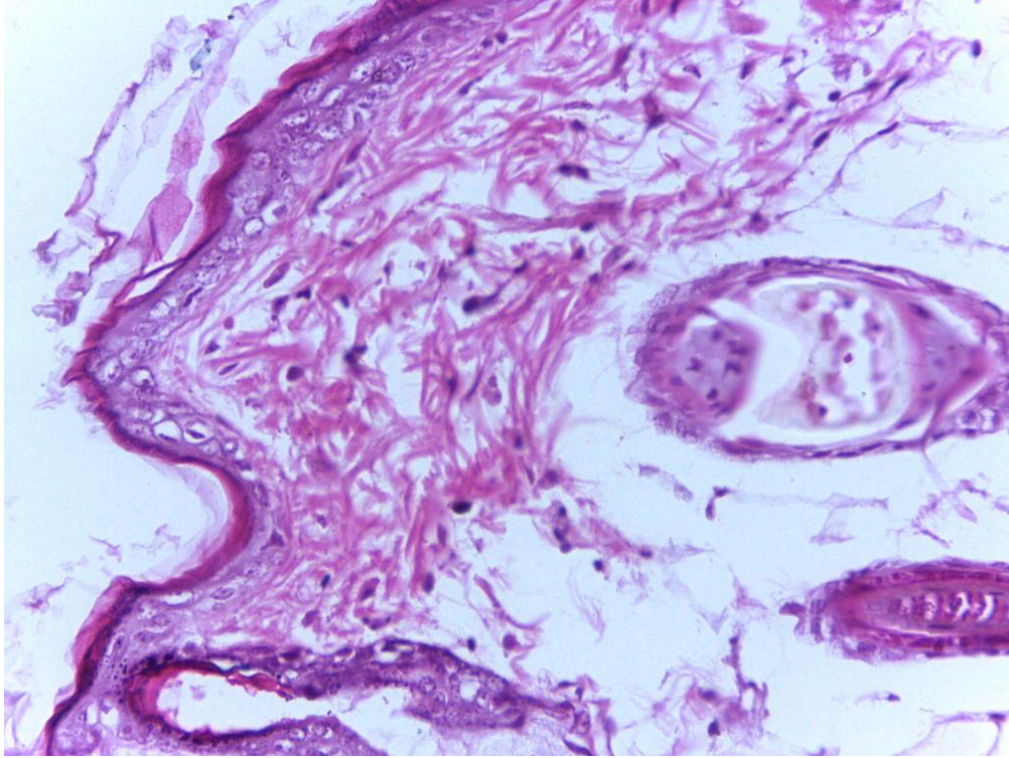
CORTES HISTOLÓGICOS – GRUPO IV

(Vistas a 40X)



CORTES HISTOLÓGICOS – GRUPO V

(Vistas a 40X)



ANEXO 6. Resultados y análisis estadístico de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de mashua

Cuantificación de Compuestos fenólicos en el extracto liofilizado de mashua

Tabla 15. Resultados obtenidos para elaborar la curva de calibración de ácido gálico

PPM	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio	Desviación estándar
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0000
1	0,043	0,044	0,042	0,043	0,0010
2	0,085	0,088	0,087	0,087	0,0015
3	0,134	0,131	0,133	0,133	0,0015
4	0,184	0,183	0,185	0,184	0,0010
5	0,241	0,242	0,241	0,241	0,0006

Tabla 16. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos del extracto liofilizado de mashua

ABS 1	ABS 2	ABS 3	Blanco	Promedio	Desviación estándar	Absorbancia corregida
0,385	0,396	0,392	0,009	0,391	0,0056	0,382

Tabla 17. Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos del extracto liofilizado, obtenido del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua), expresado en Equivalentes mg ácido gálico/ g extracto liofilizado

Cantidad ácido gálico en muestra (ppm)	El extracto seco fue diluido en 10% (g)	Luego 20 uL se disuelve en 3 mL (g extracto liofilizado/mL)	Equivalencia AG y extracto seco (μg AG/g extracto liofilizado)	Equivalencia AG y extracto seco (mg AG/g extracto liofilizado)	Comparativo EQ AG mg/g extracto
8,085	0,002	0,001	12127,511	12,128	12,1275

Cuantificación de la vitamina C en el extracto liofilizado de mashua

Tabla 18. Resultados obtenidos para elaborar la curva de calibración de ácido ascórbico

PPM	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio	Desviación estándar
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,064	0,063	0,061	0,063	0,002
10	0,117	0,121	0,115	0,118	0,003
20	0,225	0,221	0,226	0,224	0,003
40	0,445	0,444	0,442	0,444	0,002
50	0,532	0,535	0,537	0,535	0,003

Tabla 19. Resultados de la cuantificación de vitamina C del extracto de mashua

ABS 1	ABS 2	ABS 3	Blanco	Promedio	Desviación estándar	Absorbancia corregida
0,080	0,083	0,088	0,034	0,084	0,0040	0,050

Tabla 20. Cuantificación del contenido de vitamina C del extracto liofilizado, obtenido del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua), expresado en equivalentes mg ácido ascórbico / g extracto

Cantidad ácido ascórbico en extracto (ppm)	El extracto liofilizado fue diluido en 10% (g)	Luego 20 µL se disuelve en 3 mL (g extracto liofilizado / mL)	Equivalencia AA y extracto seco (µg AA/g extracto seco)	Equivalencia AA y extracto seco (mg AA/g extracto seco)	Comparativo EQ AA mg/g extracto liofilizado
3,955	0,002	0,001	5932,527	5,933	5,9325

Evaluación de la actividad antioxidante del extracto liofilizado de mashua

Tabla 21. Resultados obtenidos para elaborar la curva de calibración de ácido ascórbico

PPM	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio	Desviación estándar	Porcentaje de Inhibición
0	0,171	0,172	0,172	0,172	0,001	0,000
1	0,151	0,155	0,152	0,153	0,002	11,068
2	0,122	0,124	0,117	0,121	0,004	29,515
3	0,092	0,103	0,095	0,097	0,006	43,689
4	0,069	0,066	0,068	0,068	0,002	60,583
5	0,047	0,051	0,048	0,049	0,002	71,650
DPPH	0,171	0,172	0,172	0,1717	0,001	

Tabla 22. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante del extracto de mashua

µg/mL	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Blanco	Promedio	Desviación estándar	Absorbancia corregida	Porcentaje de inhibición
0	0,171	0,172	0,172	0,000	0,172	0,0006	0,172	0,000
200	0,136	0,135	0,138	0,002	0,136	0,0015	0,134	21,748
220	0,131	0,129	0,134	0,003	0,131	0,0025	0,128	25,243
240	0,122	0,127	0,128	0,004	0,126	0,0032	0,122	29,126
260	0,114	0,116	0,115	0,004	0,115	0,0010	0,111	35,340
300	0,108	0,103	0,101	0,005	0,104	0,0036	0,099	42,330

Tabla 23. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de la crema con extracto

µg/mL	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Blanco	Promedio	Desviación estándar	Absorbancia corregida	Porcentaje de inhibición
0	0,171	0,172	0,172	0,000	0,172	0,0006	0,172	0,000
1250	0,269	0,267	0,261	0,142	0,266	0,0042	0,124	27,961
1500	0,262	0,259	0,263	0,156	0,261	0,0021	0,105	38,641
1750	0,250	0,246	0,248	0,164	0,248	0,0020	0,084	51,068
2250	0,245	0,243	0,240	0,171	0,243	0,0025	0,072	58,252
2500	0,241	0,239	0,239	0,193	0,240	0,0012	0,047	72,816

ANEXO 7. Resultados y análisis estadístico del ensayo *in vivo* para determinar el efecto regenerador de la crema

Tabla 24. Asignación de valores según el estado de la piel por grupos

Grupo	Capa cornea	Epidermis	membrana basal	Dermis	Tejido laxo	Tejido compa	Suma
Grupo I (Blanco)	3	1	1	1	1	1	8
Grupo I (Blanco)	2	2	2	3	1	1	11
Grupo I (Blanco)	3	1	1	2	1	1	9
Grupo I (Blanco)	1	2	2	2	1	1	9
Grupo I (Blanco)	2	1	1	2	1	1	8
Grupo I (Blanco)	2	2	1	2	1	1	9
Grupo I (Blanco)	1	2	2	3	1	1	10
Grupo I (Blanco)	1	3	2	2	1	1	10
Grupo II (Control negativo)	0	0	0	1	0	0	1
Grupo II (Control negativo)	0	1	0	1	0	0	2
Grupo II (Control negativo)	0	0	0	1	0	0	1
Grupo II (Control negativo)	0	0	0	1	0	0	1
Grupo II (Control negativo)	0	1	0	1	0	0	2
Grupo II (Control negativo)	0	1	0	1	0	0	2
Grupo II (Control negativo)	0	0	0	1	0	0	1
Grupo II (Control negativo)	1	0	0	0	0	0	1
Grupo III (Control positivo)	1	2	1	1	1	1	7
Grupo III (Control positivo)	1	1	2	1	1	1	7
Grupo III (Control positivo)	1	1	2	1	1	1	7
Grupo III (Control positivo)	1	2	2	1	1	1	8
Grupo III (Control positivo)	1	2	1	1	1	1	7
Grupo III (Control positivo)	1	1	1	1	1	1	6
Grupo III (Control positivo)	1	2	2	1	1	1	8
Grupo III (Control positivo)	1	1	0	1	0	1	4
Grupo IV (Placebo)	2	1	2	1	1	1	8
Grupo IV (Placebo)	2	1	2	1	1	1	8
Grupo IV (Placebo)	2	1	2	1	1	1	8
Grupo IV (Placebo)	1	1	2	1	1	1	7
Grupo IV (Placebo)	2	1	2	1	1	1	8
Grupo IV (Placebo)	2	2	2	1	0	1	8
Grupo IV (Placebo)	1	1	2	1	1	1	7
Grupo IV (Placebo)	2	1	2	1	1	1	8
Grupo V (con 2.5% extracto)	3	1	1	1	1	1	8
Grupo V (con 2.5% extracto)	3	2	2	1	1	1	10
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	2	2	1	1	1	9
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	2	1	1	1	1	8
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	2	1	1	1	1	8
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	3	1	1	1	1	9
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	3	2	1	1	1	10
Grupo V (con 2.5% extracto)	3	3	1	1	1	1	10

Tabla 25 Pruebas de normalidad

GRUPOS	SHAPIRO-WILK		
	Estadístico	gl	Sig.
GRUPO I	0,917	8	0,408
GRUPO II	0,641	8	0,000
GRUPO III	0,810	8	0,037
GRUPO IV	0,566	8	0,000
GRUPO V	0,802	8	0,030

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera

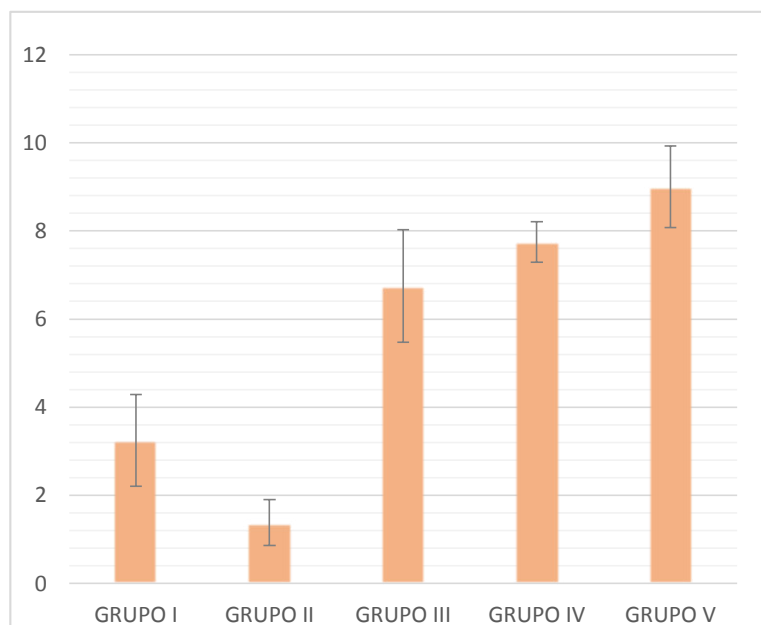
a. Corrección de significación de Lilliefors

Los datos del grupo blanco no se ajustan a una distribución normal, los otros grupos se ajustan a una distribución normal.

Tabla 26. Comparaciones entre los grupos en relación al estado de la piel

Grupos	N	Media	Desviación	p
			estándar	
Grupo I	8	3,25	1,04	0,000
Grupo II	8	1,38	0,52	
Grupo III	8	6,75	1,28	
Grupo IV	8	7,75	0,46	
Grupo V	8	9,00	0,93	

Existen diferencias significativas entre los grupos



Comparaciones entre los grupos en relación al estado de la piel.

Tabla 27. Comparaciones por pares de los grupos

	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Grupo I	0,001*	0,001**	0,003*	0,619**
Grupo II		0,001*	0,000**	0,001*
Grupo III			0,037*	0,001**
Grupo IV				0,007*

*Prueba de U de Mann Whitney; $p < 0,05$

**Prueba t de student muestras independientes; $p < 0,05$

Al realizar las comparaciones entre los pares de grupos, se concluye que no existen diferencias entre el grupo V (tto. crema 2.5 % extracto) y el grupo I (blanco).

Tabla 28. Asignación de valores según el nivel de inflamación de la piel

Grupo	Macrófagos	Edema	Suma
Grupo I (Blanco)	1	0	1
Grupo I (Blanco)	0	0	0
Grupo I (Blanco)	0	0	0
Grupo I (Blanco)	0	0	0
Grupo I (Blanco)	1	0	1
Grupo I (Blanco)	1	0	1
Grupo I (Blanco)	0	0	0
Grupo I (Blanco)	0	0	0
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo II (Control negativo)	2	3	5
Grupo III (Control positivo)	1	2	3
Grupo III (Control positivo)	2	2	4
Grupo III (Control positivo)	1	2	3
Grupo III (Control positivo)	1	1	2
Grupo III (Control positivo)	2	2	4
Grupo III (Control positivo)	1	3	4
Grupo III (Control positivo)	0	2	2
Grupo III (Control positivo)	2	3	5
Grupo IV (Placebo)	0	3	3
Grupo IV (Placebo)	1	2	3
Grupo IV (Placebo)	1	2	3
Grupo IV (Placebo)	1	2	3
Grupo IV (Placebo)	0	2	2
Grupo IV (Placebo)	0	1	1
Grupo IV (Placebo)	2	2	4
Grupo IV (Placebo)	1	2	3
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	1	3
Grupo V (con 2.5% extracto)	1	1	2
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	1	3
Grupo V (con 2.5% extracto)	2	1	3
Grupo V (con 2.5% extracto)	1	1	2
Grupo V (con 2.5% extracto)	1	1	2
Grupo V (con 2.5% extracto)	1	1	2
Grupo V (con 2.5% extracto)	1	1	2

Tabla 29. Estado de piel por capas según grupo

Estado de la piel por capas		Grupos									
		Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Capa cornea	Ausente	0	0,0%	7	87,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Discreta	3	37,5%	1	12,5%	8	100,0%	2	25,0%	0	0,0%
	Presente	3	37,5%	0	0,0%	0	0,0%	6	75,0%	5	62,5%
	Conservada	2	25,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	37,5%
Epidermis	Ausente	0	0,0%	5	62,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Dañada	3	37,5%	3	37,5%	4	50,0%	7	87,5%	1	12,5%
	Delgada	4	50,0%	0	0,0%	4	50,0%	1	12,5%	4	50,0%
	Conservada	1	12,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	37,5%
Membrana basal	Ausente	0	0,0%	8	100,0%	1	12,5%	0	0,0%	0	0,0%
	Presente	4	50,0%	0	0,0%	3	37,5%	0	0,0%	5	62,5%
	Conservada	4	50,0%	0	0,0%	4	50,0%	8	100,0%	3	37,5%
Dermis	Ausente	0	0,0%	1	12,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Dañada	1	12,5%	7	87,5%	8	100,0%	8	100,0%	8	100,0%
	Delgada	5	62,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Conservada	2	25,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Tejido laxo	Ausente	0	0,0%	8	100,0%	1	12,5%	1	12,5%	0	0,0%
	Presente	8	100,0%	0	0,0%	7	87,5%	7	87,5%	8	100,0%
Tejido compacto	Ausente	0	0,0%	8	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Presente	8	100,0%	0	0,0%	8	100,0%	8	100,0%	8	100,0%

Tabla 30. Indicadores de inflamación según grupo

Indicadores de inflamación		GRUPOS									
		Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Número de macrófagos	Menor a 20	5	62,5%	0	0,0%	1	12,5%	3	37,5%	0	0,0%
	20 a 40	3	37,5%	0	0,0%	4	50,0%	4	50,0%	5	62,5%
	40 a 100	0	0,0%	8	100,0%	3	37,5%	1	12,5%	3	37,5%
	Mayor a 100	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Tamaño de edema	Ausente	8	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Pequeño	0	0,0%	0	0,0%	1	12,5%	1	12,5%	8	100,0%
	Mediano	0	0,0%	0	0,0%	5	62,5%	6	75,0%	0	0,0%
	Grande	0	0,0%	8	100,0%	2	25,0%	1	12,5%	0	0,0%

ANEXO 8. Cálculos para la expresión de resultados en relación a los tubérculos frescos

Rendimiento:

2 kg tubérculos frescos..... 1,383 kg gel

Sólo se utilizó 1.00 kg de gel y se sometió a proceso de liofilización.

Extrapolando se deduce que: 1,00 kg de gel se obtiene a partir de 1,446 kg de tubérculos frescos.

1,00 kg de gel.....104 g de extracto liofilizado.

Entonces:

1,446 kg tubérculo fresco.....1,00 kg gel.....104 g extracto

1,00 kg tubérculo fresco..... X = 71,923 g extracto

Compuestos fenólicos

1,00 g extracto liofilizado contiene 12,128 mg A.G.

Entonces

1000 g tubérculos frescos.....71,923 g extracto

X= 13,904 g tubérculos frescos..... 1,00 g extracto.....12,128 mg A.G.

100 g tubérculos frescos..... Y= 87,227 mg A.G.

Ácido ascórbico

1,00 g extracto liofilizado contiene 5,93 mg A.A.

Entonces

1000 g tubérculos frescos.....71,923 g extracto

X= 13,904 g tubérculos frescos..... 1,00 g extracto.....5,93 mg A.A.

100 g tubérculos frescos..... Y= 42,649 mg A.A.

Actividad antioxidante expresada en VCEAC

1,00 g extracto liofilizado..... 8,956 VEAC mg A.A.

Entonces

1000 g tubérculos frescos.....71,923 g extracto

X= 13,904 g tubérculos frescos..... 1,00 g extracto.....8,956 VEAC mg A.A.

100 g tubérculos frescos..... Y= 64,41 mg A.A