

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN - HUÁNUCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“CONTENIDO DE ANTOCIANINAS, POLIFENOLES TOTALES,
VITAMINA C Y RENDIMIENTO DE COLORANTE EN MASHUA
NEGRA (*Tropaeolum tuberosum*) CULTIVADO EN TRES
ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TESISTA:

Bach. ROLEN EVER ANAYA SOTO

ASESOR:

Dr. ÁNGEL DAVID NATIVIDAD BARDALES

HUÁNUCO – PERÚ

2018

DEDICATORIA

Lo dedico a mi madre, quien me brindó su apoyo en todo momento, a mi padre que está en el cielo; como también a mis hermanos quienes colaboraron en mi formación profesional y demás familiares quienes me incentivaron por el camino correcto hacia el éxito en fin a todos ellos.

AGRADECIMIENTO

Agradecer al divino creador, por concederme una vida saludable y llena de bendiciones.

A mi “Alma Mater” la Universidad Nacional “Hermilio Valdizán”; centro superior de estudios que me acogió en sus aulas durante cinco años de formación profesional, Facultad de ciencias Agrarias- Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

Al Dr. Ángel David, Natividad Bardales; por el asesoramiento permanente y colaboración en la ejecución del presente trabajo de investigación.

De la misma manera agradezco al Dr. Juan Edson, Villanueva Tiburcio y al Dr. Rubén Max, Rojas Portal; por las guías que me otorgaron en la presente investigación.

Finalmente agradezco a algunos familiares y amigos quienes colaboraron en este trabajo de investigación.

RESÚMEN

La mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*), se consume por su valor diurético y nutritivo, tienen apreciables cantidades de aminoácidos esenciales como lisina, carbohidratos, fibra, proteínas, vitaminas A, C y minerales como P, Ca, He.

La investigación tuvo como objetivo evaluar el contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivado en tres altitudes de la región Huánuco. La caracterización físico química en mashua negra para el caso de pH, acidez titulable, sólidos solubles, grasa, humedad y cenizas, se determinaron por los métodos de la AOAC (1997,2005 y 2000); en el caso de pH (6,19; 6,21 y 6,28), sólidos solubles (5,33; 2,77 y 6,03 g de sacarosa/ g de líquido), humedad (87,83; 89,06 y 86,19 %) y cenizas (4,96; 4,72 y 4,20 %), varían de acuerdo a la altitud donde fue cultivada la mashua negra; en cuanto a acidez titulable (0,32; 0,29 y 0,31 g AA/ g de muestra) y grasa (0,71; 0,64 y 0,60 %), no están influenciados por la altitud. Así mismo referente a los compuestos bioactivos; fueron mejores a 3463 msnm, para el caso de antocianinas (método de pH diferencial) con un valor de 0,1130 mg cianidina-3-glucósido/ g de muestra; en cuanto a polifenoles totales (método de azul de prussian) con un valor de 365,54 µg AGE/ g de muestra y para el ácido ascórbico (método de HPLLC) con un valor de 327,13 µg AA/g de muestra; entonces los compuestos bioactivos sí estuvieron influenciados por la altitud. La actividad antioxidante por DPPH y ABTS; fueron mejores a 3463 msnm, en cuanto a DPPH con un valor de 391,12 mg TE/ g de muestra y ABTS con un valor de 267,68 mg TE/ g de muestra, estuvieron influenciados por la altitud. Referente al IC₅₀ DPPH y ABTS, el primero de ellos no estuvo influenciado por la altitud, en cuanto a IC₅₀ ABTS la muestra ubicado a 3463 msnm fue el mejor con un valor de 0,0008 g/ ml de muestra, aquí si influyó la altitud. El mejor rendimiento de colorante en mashua negra fue a 3463 msnm con un 64,00 %.

Palabras clave: Antocianinas, polifenoles , vitamina C, altitudes, colorante.

SUMMARY

The black mashua (*Tropaeolum tuberosum*), is consumed for its diuretic and nutritive value, have appreciable quantities of essential amino acids such as lysine, carbohydrates, fiber, proteins, vitamins A, C and minerals such as P, Ca, He.

The objective of the research was to evaluate the content of anthocyanins, total polyphenols, vitamin C and dye yield in black mashua (*Tropaeolum tuberosum*) grown in three altitudes of the Huánuco region. The physical chemical characterization in black mashua for the case of pH, titratable acidity, soluble solids, fat, moisture and ash, was determined by the AOAC methods (1997,2005 and 2000); in the case of pH (6.19, 6.21 and 6.28), soluble solids (5.33, 2.77 and 6.03 g of sucrose / g of liquid), humidity (87.83, 89, 06 and 86.19%) and ashes (4.96, 4.72 and 4.20%), vary according to the altitude where black mashua was cultivated; in terms of titratable acidity (0.32, 0.29 and 0.31 g AA / g of sample) and fat (0.71, 0.64 and 0.60%), they are not influenced by altitude. Also referring to the bioactive compounds; they were better at 3463 masl, for the case of anthocyanins (differential pH method) with a value of 0.1130 mg cyanidin-3-glucoside / g sample; as for total polyphenols (prussian blue method) with a value of 365.54 µg AGE / g of sample and for ascorbic acid (HPLLC method) with a value of 327.13 µg AA / g of sample; then the bioactive compounds were influenced by altitude. The antioxidant activity by DPPH and ABTS; they were better at 3463 masl, in terms of DPPH with a value of 391.12 mg TE / g of sample and ABTS with a value of 267.68 mg TE / g of sample, were influenced by altitude. Regarding IC50 DPPH and ABTS, the first of them was not influenced by altitude, in terms of IC50 ABTS, the sample located at 3463 masl was the best with a value of 0.0008 g / ml of sample, here the altitude influenced . The best coloring performance in black mashua was at 3463 masl with 64.00%.

Key words: Anthocyanins, polyphenols, vitamin C, altitudes, coloring.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESÚMEN	IV
SUMMARY	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	04
2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	04
2.1.1. Mashua	04
2.1.1.1. Clasificación taxonómica de la mashua	04
2.1.1.2. Descripción botánica	05
2.1.1.3. Cultivo de la mashua	05
2.1.1.4. Rendimiento	06
2.1.1.5. Usos	06
2.1.1.6. Valor nutritivo	06
2.1.2. Antocianinas	08
2.1.2.1. Factores que afectan el color y estabilidad de las antocianinas	11
2.1.2.2. Extracción de las antocianinas	13
2.1.3. Compuestos fenólicos	15
2.1.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos	15
2.1.4. Actividad antioxidante	17
2.1.4.1. Clasificación de los antioxidantes	21
2.1.4.2. Usos de los antioxidantes en los alimentos	23
2.1.4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante	24
2.1.5. Ácido ascórbico	25
2.1.6. Colorantes	25

2.1.6.1. Clasificación de los colorantes	26
2.1.6.2. Métodos de extracción de colorantes	26
2.2. ANTECEDENTES	27
2.3. HIPÓTESIS	31
2.3.1. Hipótesis general	31
2.3.2. Hipótesis específicos	31
2.4. VARIABLES	31
2.4.1. Variable independiente	31
2.4.2. Variable dependiente	31
2.4.3. Operacionalización de variables	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	33
3.2. LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN	33
3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS	33
3.3.1. Población	33
3.3.2. Muestra	33
3.3.3. Unidad de análisis	34
3.4. TRATAMIENTO EN ESTUDIO	34
3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS	36
3.5.1. Diseño de la investigación	37
3.5.2. Datos a registrar	38
3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información	39
3.6. MATERIALES Y EQUIPOS	40
3.6.1. Materia prima	40
3.6.2. Materiales	40
3.6.3. Equipos	40
3.6.4. Reactivos	41
3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	42
3.7.1. Caracterización físico química en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.	42

3.7.2.	Determinación de los compuestos bioactivos en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.	43
3.7.2.1.	Cuantificación de antocianinas totales por el método del pH diferencial.	43
3.7.2.2.	Cuantificación de polifenoles totales mediante el método de azul de prussian.	45
3.7.2.3.	Cuantificación de ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia.	46
3.7.3.	Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.	47
3.7.3.1.	Determinación de actividad antioxidante por el método del radical DPPH.	47
3.7.3.2.	Determinación de la actividad antioxidante método del ABTS.	49
3.7.4.	Rendimiento de colorante en mashua negra.	50
IV.	RESULTADOS	52
4.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	51
4.2.	DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	54
4.3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	56
4.3.1.	Porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y agua en mashua negra.	56
4.3.2.	Actividad antioxidante IC ₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico en mashua negra.	58
4.4.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE COLORANTE EN	59

	MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	
V.	DISCUSIÓN	61
5.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	61
5.2.	DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	62
5.3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	65
5.3.1.	Porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y agua en mashua negra.	65
5.3.2.	Actividad antioxidante IC ₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico en mashua negra.	66
5.4.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE COLORANTE EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.	67
VI.	CONCLUSIONES	69
VII.	RECOMENDACIONES	70
VIII.	LITERATURA CITADA	71
	ANEXOS	79

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Título	Pág.
Cuadro 1	Composición química de la mashua	07
Cuadro 2	Caracterización físico química de la mashua negra	08
Cuadro 3	Estructura básica de las antocianinas	10
Cuadro 4	Métodos de extracción de antocianinas	14
Cuadro 5	Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura	16
Cuadro 6	Contenido de fenoles totales de diferentes tubérculos	17
Cuadro 7	Mecanismos de acción de los antioxidantes	19
Cuadro 8	Clasificación de los colorantes	26
Cuadro 9	Operacionalización de las variables para el estudio	32
Cuadro 10	Ubicación de las muestras de la mashua negra a diferentes altitudes	34
Cuadro 11	Tratamientos para extraer los principios activos.	35
Cuadro 12	Extracción de antocianinas empleando los tres tratamientos	35
Cuadro 13	Preparación de muestras para actividad antioxidante por IC ₅₀ DPPH y ABTS empleando tratamiento tres	36
Cuadro 14	Caracterización físico química en mashua negra	53
Cuadro 15	Compuestos bioactivos en mashua negra	54
Cuadro 16	Actividad antioxidante por DPPH y ABTS en trolox equivalente.	57
Cuadro 17	Actividad antioxidante IC ₅₀ DPPH y ABTS	58
Cuadro 18	Rendimiento de colorante en mashua negra	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Pág.
Figura 1	Estructura básica de las antocianinas	09
Figura 2	Cambios en la estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH	10
Figura 3	Estructura básica de los compuestos fenólicos	15
Figura 4	La función antioxidante	18
Figura 5	Esquema experimental de la investigación	42
Figura 6	Contenido de antocianinas en mashua negra	54
Figura 7	Contenido de polifenoles totales en mashua negra	55
Figura 8	Contenido de ácido ascórbico en mashua negra	56
Figura 9	Actividad antioxidante por DPPH y ABTS en trolox equivalentes	57
Figura 10	Actividad antioxidante IC ₅₀ DPPH y ABTS	59
Figura 11	Rendimiento de colorante en mashua negra (%)	60

I. INTRODUCCIÓN

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*) es una planta herbácea de 20 a 80 cm de alto, de tallos aéreos, cilíndricos y delgados de 2 a 4 mm de diámetro, ramificados de color púrpura. Tiene hojas de color verde oscuro brillante en el haz y verde claro en el envés, las flores son solitarias de diferentes colores que van de anaranjadas o rojizas. Los tubérculos pueden ser cónicos alargados rectos o curvos, su color puede variar entre blanco amarillento, amarillo claro, amarillo oscuro, anaranjado, morado jaspeado y negra dependiendo su variedad, son por lo general de 5 a 15 cm de largo y de 3 a 6 cm de ancho. (Hernández y León, 1992).

La mashua, a pesar de tener cualidades de rusticidad, tolerancia a enfermedades y plagas, buen rendimiento y bajo insumo para su cultivo, no tiene una buena demanda en el mercado. Perú es el país con mayor superficie de producción con alrededor de 7244 Ha, todas estas localizados en áreas de la región andina del país. El rendimiento del tubérculo en Perú es de 5,2 t/Ha. (Grau *et al*, 2003). Su hábitat de distribución natural se extiende, entre los 2400 hasta los 4300 msnm. (Manrique *et al*, 2013).

El cultivo de la mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) en la región Huánuco ha crecido en los últimos años, el valor nutritivo de la mashua es alto, algunas variedades de este tubérculo pueden contener apreciables cantidades de carotenos (vitamina A), vitamina C, aminoácidos esenciales como lisina, aminoácido limitante en muchos cereal y leguminosa (Espinoza *et al*, 2002). También la mashua negra contiene importante contenido de antocianinas que son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de los frutos o flores, es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano (Márquez, 2011).

El limitado uso y la poca diversificación de las antocianinas, polifenoles totales, vitamina C, la capacidad antioxidante y rendimiento de colorante en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco, sugiere el desarrollo de la presente investigación como una propuesta de alternativas en cuanto a salud

se refiere, ya que la mashua presenta un alto contenido de valor nutritivo, propiedades anticancerígenas y sobre todo actúan como poderos antioxidantes para evitar la oxidación y el envejecimiento celular, por su valor diurético y es más es beneficioso para la salud humana y finalmente proporcionar una información sólida y veras para la gente del campo para que sigan apostando por este producto bandera; inculcar a los agricultores a que siembren más y sacar al mercado a venderlos como un producto apto para el consumo humano y siempre generando una visión empresarial en la región, y de esa manera salir adelante desarrollando nuevos proyectos.

Con esta tesis, se pretende dar énfasis a los colorantes naturales como las antocianinas y por ende dejar de lado los colorantes sintéticos, asimismo se busca difundir conocimientos basados en el contenido de antocianinas, polifenoles totales y la vitamina C de la mashua negra cultivado en diferentes altitudes de la regio Huánuco.

En la investigación se evaluó a qué altitud de la región Huánuco la mashua negra presenta mejores características físico químicas, compuestos bioactivos, capacidad antioxidante y rendimiento de colorante. La materia prima fue recolectada a tres altitudes diferentes: a 4039 msnm (C.P. San Joaquin, San Rafael - Ambo), a 3814 msnm (Ayapiteg – chavinillo) y a 3463 msnm (Sillapata – Dos de Mayo); y tuvo como objetivos:

Objetivo general

- Evaluar el contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivado en tres altitudes de la región Huánuco.

Objetivos específicos

- Evaluar la caracterización físico química en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.
- Determinar los compuestos bioactivos en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

- Determinar la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.
- Evaluar el rendimiento de colorante en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivado en tres altitudes de la región Huánuco.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1.1. Mashua

Según Manrique *et al.* (2013), manifiestan que la mashua es 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 la oca, el ulluco y las papas. 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 auto consumo o la generación de ingresos monetarios. La mashua es una especie rústica, que puede crecer bien a temperaturas bajas y en suelos pobres, sin necesidad de fertilizantes. Además es resistente a nematodos, insectos y varias plagas, como el gorgojo de la papa (*premnotrype spp*). Por esta razón en los andes se siembra habitualmente como cerco perimétrico de otros cultivos.

2.1.1.1. Clasificación taxonómica de la mashua

Según Temoche *et al.* (2004), la ubicación taxonómica de la mashua es la siguiente:

Reino	: Vegetal
Clase	: <i>Angiospermas</i>
Sub clase	: <i>Dicotiledoneas</i>
Orden	: <i>Geraniales</i>

Familia	: <i>Tropaeolaceae</i> .
Género	: <i>Tropaeolum</i> .
Especie	: <i>Tuberosum R. et P</i>
Nombre científico	: <i>Tropaeolum tuberosum R. et P</i>
Nombres comunes	: Mashua”, “añu”, “cubios”, “navios”, “Isaño”, “isañu

2.1.1.2. Descripción botánica

Según Hernández y León (1992) la mashua es una planta herbácea de 20 a 80 cm de alto, de tallos aéreos, cilíndricos y delgados de 2 a 4 mm de diámetro, ramificados de color púrpura. Tiene hojas de color verde oscuro brillante en el haz y verde claro en el envés, las flores son solitarias de diferentes colores que van de anaranjadas o rojizas. Los tubérculos pueden ser cónicos alargados rectos o curvos, el aspecto ceroso de la superficie se debe a la epidermis gruesa de sus paredes exteriores, su color puede variar entre blanco amarillento, amarillo claro, amarillo oscuro, anaranjado, morado jaspeado y negra dependiendo su variedad, son por lo general de 5 a 15 cm de largo y de 3 a 6 cm de ancho.

Según Ortega (1992) señala que existen al menos de nueve colores: blanco amarillento, amarillo pálido, amarillo, amarillo naranja, naranja, rojo grisáceo, rojo grisáceo oscuro, púrpura grisácea y negra, siendo dominante el amarillo con ojos negruzcos o anaranjados. También son comunes los tubérculos con fondo claro con color secundario, distribuido en los ojos y bandas irregulares sobre tuberizaciones o también en forma de puntos densos o manchas irregularmente distribuidos. Los ojos del mashua son siempre profundos, anchos y estrechos, sin brácteas.

2.1.1.3. Cultivo de la mashua

Según Giannoni (2018) manifiesta que el cultivo de la mashua es similar al de la papa. Se le cosecha entre los 6 y 8 meses. Los tubérculos se pueden almacenar hasta seis meses en lugares fríos y ventilados. Es de alta productividad y crece mejor entre los 2,400 y 4,300 msnm.

2.1.1.4. Rendimiento

Según Grau *et al.* (2003), manifiestan que la mashua a pesar de tener cualidades de rusticidad, tolerancia a enfermedades y plagas, buen rendimiento y bajo insumo para su cultivo, no tiene una buena demanda en el mercado. Perú es el país con mayor superficie de producción con alrededor de 7244 ha, mientras que en Bolivia no sobrepasan las 100 ha; no existe estadísticas de Ecuador pero se estima que el cultivo del país no sobrepasa las 50 ha, todas estas localizados en áreas desoladas de la región andina del país. El rendimiento del tubérculo en Perú es de 5,2 t/Ha.

2.1.1.5. Usos

Según Ortega (1992) la mashua se utiliza en diversas aplicaciones gastronómicas como en la preparación de sopas, purés, ensaladas, mermeladas, harinas y postres en general. Además, el tubérculo se cultiva con el objeto de aprovechar con fines medicinales y ornamentales, preparando fundamentalmente bebidas medicinales debido a su poder para eliminar dolencias renales, problemas de la próstata, enfermedades del hígado y disminuir la generación de radicales libres que genera cáncer. Asimismo, posee efectos insecticidas, nematocidas, bactericidas y cierta cantidad es destinada para el consumo animal.

Según Salas (1998) señala que la mashua generalmente se consume por su valor diurético y nutritivo, es consumida de tres formas fundamentales con agrado por adultos y niños del área rural: Cocido, en una pachamanca, o en el horno ya que adquiere un sabor especial semejante al camote, además es el modo en el cual se elimina por completo el sabor picante y astringente, los cuales son factores fundamentales para aumentar su consumo e industrialización.

2.1.1.6. Valor nutritivo

Según Manrique *et al.* (2013), manifiesta que la mashua tienen un elevado contenido de proteínas (mayores a los de la papa, la oca y el olluco), carbohidratos, fibra, ácido ascórbico (vitamina C) y calorías. También contienen una elevada concentración de glucosinolatos aromáticos que al ser

hidrolizados se transforman en isotiocianatos, compuestos químicos responsables de otorgar el típico sabor picante a los tubérculos. Los isotiocianatos son conocidos por sus propiedades antibióticas, insecticidas, nematocidas, anticancerígenas y diuréticas, lo que contribuye a sustentar el uso tradicional de la mashua en la medicina folclórica de los Andes.

Según Espinoza *et al.* (2002), manifiestan que el valor nutritivo de la mashua es alto, algunas variedades de este tubérculo pueden contener apreciables cantidades de carotenos (vitamina A), vitamina C, además tiene una cantidad elevada de aminoácidos esenciales como lisina, aminoácido limitante en muchos cereal y leguminosa. Además contiene minerales como el K, P, Fe, Mn, Zn, Cu y en su almacenamiento de éstas, aumenta la dulzura, esto se debe a la hidrolización de los almidones en azúcar, asimismo el valor nutritivo supera a la papa. En el cuadro 1, se puede observar la composición química de la mashua.

Cuadro 1. Composición química de la mashua (g/100 g).

Componentes	Base húmeda (b.h.)			Base seca (b.s.)	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	Rango	Promedio	Promedio	Rango	Promedio
Humedad (%)	79,10-88,80	87,40	86,00	-	-
Carbohidratos (g)	-	9,80	11,00	-	78,60
Proteína (g)	1,13- 2,65	1,50	1,60	6,70-15,70	11,40
Grasa (g)	-	0,70	0,60	0,10- 1,40	4,30
Cenizas (g)	0,56- 1,08	0,60	0,80	4,20- 6,50	5,70
Fibra (g)	-	0,90	0,80	7,80- 8,60	-
Azúcares (g)	5,37- 9,33	-	-	-	-
Potasio (mg)	1,28- 1,76	-	-	-	-
Fósforo (mg)	0,61- 0,83	29,00	42,00	-	300,00
Calcio (mg)	-	12,00	7,00	-	50,00
Hierro (mg)	-	1,00	1,20	-	8,60
Vitamina. A (mg)	-	-	15,00	-	214,00
Tiamina (mg)	-	0,10	0,06	-	0,46
Riboflavina. (mg)	-	0,12	0,08	-	0,57
Niacina (mg)	-	0,67	0,60	-	4,30
Vitamina C (mg)	-	77,50	67,00	-	476,00

Fuente:

(1) Tapia (2012), (2) Collazos *et al.* (1993), (3) Meza *et al.* (1997), (4) King (1986), citado por Ramallo (1999), (5) National Reserach Council (1989).

Según Taipe (2017) la caracterización físico química realizada en mashua negra se aprecia en el cuadro 2, donde se evaluaron el pH, acidez titulable, sólidos solubles; por otra parte cenizas, grasa y humedad.

Cuadro 2. Caracterización físico química de la mashua negra (g/100g de muestra*).

Componente	Contenido
Humedad*	85,730 ±0,069
Grasa*	0,452 ±0,005
Ceniza*	0,607±0,008
pH	6,29 ±0,010
Acidez titulable	1,53 ±0,045
Sólidos solubles	6,120±0,226

* Se determinó en 100 g de muestra.

Fuente: Taipe (2017)

2.1.2. Antocianinas

Según Márquez (2011) menciona que la palabra antocianina deriva del griego anthos (flor) y kyanos (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de los frutos o flores, es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano. Las antocianidinas (agliconas) son la estructura básica de las antocianinas. Constan de un anillo aromático (A) unido a un anillo heterocíclico (C) que contiene oxígeno, el cual está unido por un enlace carbono - carbono a un tercer anillo aromático (B). El esqueleto básico de las antocianinas es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de flavilio con diferentes sustituciones. Cuando las antocianidinas están en su forma glicosidada se

conocen como antocianinas. Los monosacáridos comúnmente encontrados son D-glucosa, L - ramnosa, D-arabinosa y D - xilosa aunque también pueden contener oligosacáridos como gentobiosa, rutinosa y soforosa. Normalmente los monosacáridos se unen con los grupos hidroxilo de la posición 3 de la antocianidina, mientras que los disacáridos sustituyen los hidroxilos 3 y 5 o los de la posición 3 y 7.

Según Inostroza *et al.* (2015), las antocianinas expresadas en su forma estándar (cianidina-3-glucosido/g), el contenido de antocianinas en mashua negra es; $192,63 \pm 1,28$ (mg equivalente/100 g PF).

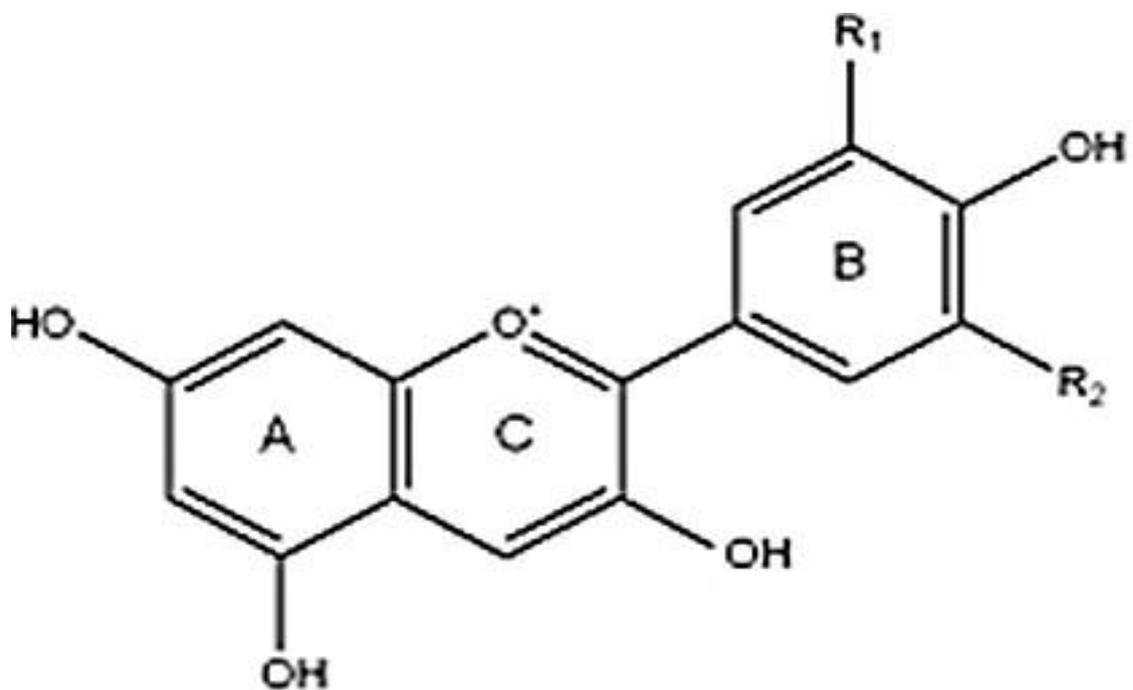


Figura 1. Estructura básica de las antocianinas

Fuente: Santacruz (2011).

La estructura básica de las antocianinas, medido con el espectro visible en nm, presentan diferentes colores, para su mejor entendimiento todo ello se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Estructura básica de las antocianinas

Antocianinas	R1	R2	Espectro visible (nm)
Pelargonidina	H	H	494 (Naranja)
Cianidina	OH	H	506 (Naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (Azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (Naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (Azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (Azul-rojo)

Fuente: Santacruz (2011).

Los cambios en la estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH se muestran en la figura 2.

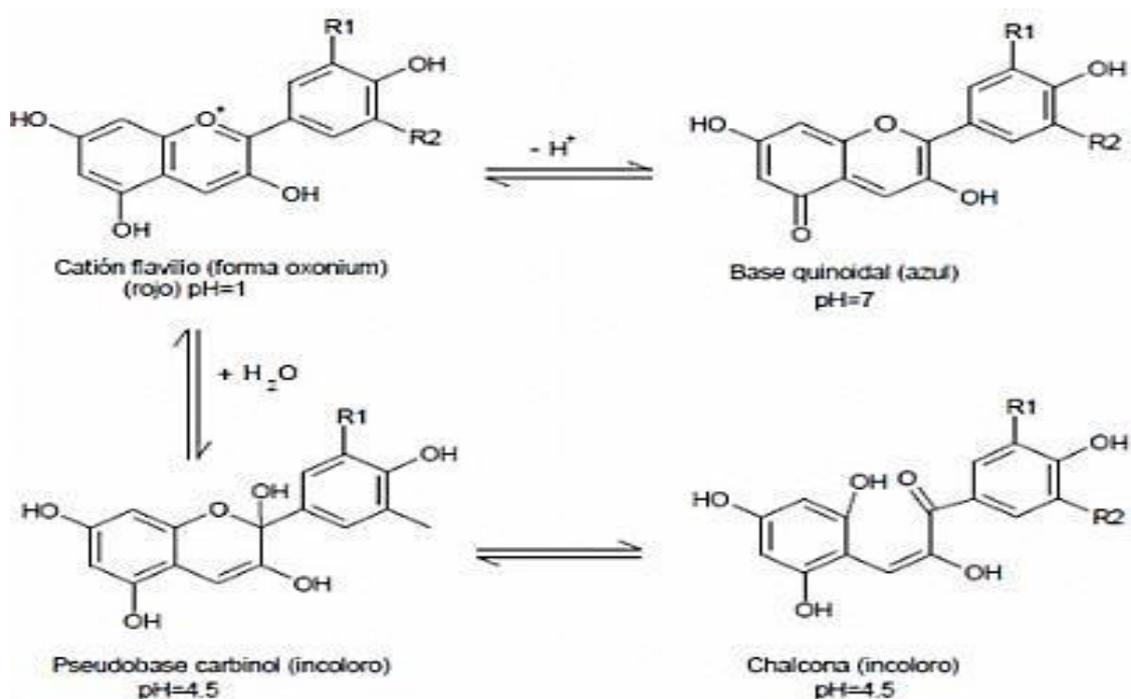


Figura 2. Cambios en la estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.

Fuente: Santacruz (2011).

2.1.2.1. Factores que afectan el color y estabilidad de las antocianinas

Según Wrolstad (2000) las antocianinas son sustancias relativamente inestables en estado puro, sin embargo, son resistentes en la naturaleza a las condiciones de luz, pH y la oxidación debido a su interacción con otras moléculas: aminoácidos, ácidos orgánicos, taninos. Los principales factores que afectan la degradación de estos pigmentos son el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno. Factores que ordinariamente tienen menos importancia son la presencia de enzimas degradativas, ácido ascórbico, dióxido de azufre, iones metálicos y azúcares. La copigmentación puede afectar la velocidad de degradación. A continuación se describen algunos factores que afectan la estabilidad de las antocianinas.

- **Estructura y pH**

Según Márquez (2011) señala que las antocianinas por su diversidad estructural no son igualmente resistentes a los efectos de deterioro de varios agentes. Cuando el grado de hidroxilación de la aglicona se incrementa, la estabilidad generalmente decrece; por otro lado la sustitución con grupos metoxilos tiene un efecto contrario. La glicosidación de los grupos hidroxilo libres incrementa la estabilidad, similar efecto al de la metoxilación presumiblemente debido al bloqueo de los grupos hidroxilos reactivos. Las antocianinas diglicosiladas son más estables a la decoloración durante el almacenamiento, calor y exposición a la luz que los monoglicósidos. La naturaleza del azúcar también tiene efecto protector. La estabilidad de especies coloreadas, especialmente la base quinoidal, quizá está proporcionada por la presencia de grupos acilo ligados a los azúcares en la molécula, esto es, por copigmentación intramolecular. Las antocianinas que contienen dos o más grupos muestran una excelente estabilidad a través de un completo rango de pH. La estabilidad conferida por la copigmentación intramolecular se atribuye al apilamiento de residuos aromáticos del grupo acilo con el anillo piranósido en la molécula de antocianina.

Según Márquez (2011) el pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En

soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH⁺) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A⁻) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. En la Figura 2 se muestra estructura y estabilidad de las antocianinas a diferentes valores de pH.

- **Temperatura**

Según Timberlake (1980) la mayoría de las reacciones químicas la estabilidad de las antocianinas y la velocidad de su degradación, en forma natural y en sistemas modelo, es notablemente influenciada por la temperatura. La estabilidad térmica de las antocianinas varía con su estructura, pH, presencia de oxígeno e interacciones con otros componentes en el sistema. En general, comportamientos estructurales que conducen a incrementar la estabilidad a un determinado pH, también conducen a incrementar la estabilidad térmica, por ejemplo, la hidroxilación de la aglicona decrece la estabilidad, mientras que la metoxilación, glucosilación y acilación tienen el efecto opuesto. En presencia de oxígeno, la máxima estabilidad térmica de la antocianidina 3-glucósido ha sido observada a un pH de 1,8 a 2,0; mientras que la de la antocianidina 3,5-diglucósido ha sido observada a un pH de 4,0 a 5,0. La degradación de la antocianina es virtualmente independiente del pH a un pH de 2,0 a 4,5 en ausencia de oxígeno.

- **Oxígeno**

Según Timberlake (1980) señala que el oxígeno puede causar una degradación de las antocianinas mediante un mecanismo de oxidación directo y/o una oxidación indirecta mediante la oxidación de constituyentes del medio que reaccionan con las antocianinas formando compuestos incoloros o pardos.

- **Luz**

Según Markakis (1982) la luz tiene dos efectos sobre las antocianinas; favorece su biosíntesis pero también acelera su degradación. Estos compuestos son generalmente inestables al ser expuestos a la luz ultravioleta y visible o ante cualquier otra fuente de radiación ionizante. Las antocianinas preservan mucho su color cuando se mantienen en oscuridad.

- **Enzimas**

Según Timberlake (1980) señala que las enzimas están implicadas en la decoloración de las antocianinas. Se han identificado dos grupos: Las glicosidasas y polifenoloxidasas. En conjunto, se las conoce como antocianasas. Las glicosidasas hidrolizan los enlaces glicosídicos quedando el azúcar o azúcares y el aglicón separados. La pérdida de intensidad del color se debe al descenso de la solubilidad de las antocianinas y su transformación en productos incoloros.

- **Copigmentación**

Según Timberlake (1980) la copigmentación se define como un fenómeno por el cual el color de las antocianinas se vuelve más azul, brillante y estable, debido a la interacción entre diferentes sustancias orgánicas y las antocianinas refiriéndose específicamente como copigmentación intermolecular. El efecto que produce este fenómeno se refleja en un incremento de la intensidad del color (efecto hiperocrómico) así como un desplazamiento de la longitud de máxima absorbancia hacia mayores longitudes de onda (efecto batocrómico) lo que da como resultado una mayor profundidad del color. No solo la naturaleza de las antocianinas tiene influencia sobre los efectos que produce la copigmentación, factores como la glicosilación y la hidroxilación son necesarios para que este fenómeno se produzca, asimismo, la presencia de ácidos en la molécula de antocianina pueden afectar su eficiencia.

2.1.2.2. Extracción de las antocianinas

Según Leyva (2009) manifiesta que la elección de un método de extracción es de gran importancia en el análisis y depende en gran parte del propósito de la extracción, la naturaleza de las antocianinas y la fuente del

material; los métodos de extracción de las antocianinas se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Métodos de extracción de antocianinas

Método	Características
0,001 % HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0,001 % HCl en etanol	80% tan efectivo como el metanol.
0,001 % HCl en agua	27 % tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificada con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1000 ppm de SO ₂	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistemas de etanol: ácido acético: agua.

Fuente: Leyva (2009)

Según Leyva (2009) un buen procedimiento de extracción debe maximizar la recuperación de estos pigmentos y minimizar la cantidad de adjuntos y la degradación o alteración del estado natural. El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en muchos disolventes diferentes como alcoholes, acetona, dimetil sulfóxido y agua. En la mayoría de frutas y verduras, los pigmentos antocianínicos están localizados en células cerca de la

superficie. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de solventes ácidos.

2.1.3. Compuestos fenólicos

Según Gil (2010) los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente, como la protección frente a herbívoros e infecciones microbianas, así como en el proceso de atracción de polinizadores.

Según Díaz (2009) los compuestos fenólicos o **polifenoles**, son las sustancias que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.) (Figura 3). Se han identificado más de 8000 estructuras fenólicas que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Los hay simples, de bajo peso molecular con un único anillo aromático y complejos como los taninos y los derivados polifenólicos.

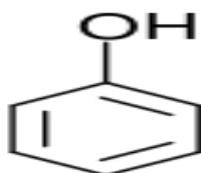


Figura 3. Estructura básica de los compuestos fenólicos

Fuente: Díaz (2009).

2.1.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

Según Waterhouse (2002) manifiesta que por la gran cantidad de compuestos fenólicos identificados, su clasificación es una tarea compleja. Una de las más utilizadas es la propuesta por Waterhouse, que agrupa a los fenoles

en función de su estructura química básica. La clasificación se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura.

Estructura		Clasificación
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoles
		Flavonas
		Flavan-3-oles
		Proantocianidinas (taninos no hidrolizables)
		Antocianidinas (Antocianos)
		Flavanonas
		Isoflavonas
No Flavonoides	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos
	C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzoicos
	(C ₆ -C ₁)	} +Azúcar Taninos hidrolizables
	(C ₆ -C ₃)	
	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos

Fuente: Waterhouse (2002).

Según Campos *et al.* (2006), diversos estudios se han realizado sobre fenoles totales en diferentes tubérculos; la mashua ARB-5241 o morada que presenta un alto contenido de compuestos fenólicos con 3,37 mg/g en muestra fresca, y también nos menciona que el contenido de compuestos fenólicos totales en mashua se encuentran en un rango de 0,92 a 3,37 mg/g en muestra fresca.

Según Chirinos *et al.* (2007), el estudio realizado en mashua, variedad chaucha reportó que su contenido de polifenoles fue de 3,767 mg equivalente de ácido gálico/ g b.s. o a su vez 37,67 mg equivalente de Ácido Gálico/100 g de mashua fresca.

Según Inostroza *et al.* (2015), el contenido de polifenoles totales en mashua negra expresados en ácido gálico; fue 314,12 ± 1,23 (mg equivalente/ 100 g PF).

Según Taipe (2017) señala que el contenido de fenoles totales en mashua negra en promedio fue $15,16 \pm 0,569$ (mg de AG/g de muestra).

El contenido de fenoles totales o polifenoles, de algunos tubérculos diferentes; pues se detalla en el siguiente cuadro 6.

Cuadro 6. Contenido de fenoles totales de diferentes tubérculos.

Material vegetal	Concentración
Púrpura	Fresco:3588,4 mg GAE/g 100g de muestra
	Cocido:1707,8 mg GAE/g 100g de muestra
Oca	Fresco:2949,1 mg GAE/g 100g de muestra
	Cocido:1166,75 mg GAE/g 100g de muestra
Rosada	Fresco:1034,3 mg GAE/g 100g de muestra
	Cocido:148,0 mg GAE/g 100g de muestra
-	1,2 μ mol TE/g (b.s.)
-	115,2 \pm 1,96 mg GAE/g 100g de muestra b.s.
Yacon	10,2 mg GAE/g 100g de muestra b.s
	1017 \pm 6,09 mg GAE/g 100g de muestra b. s.
Papa	2.87-10,02 mg de ácido clorogénico
Nativa	

Fuente: Ramos (2011).

2.1.4. Actividad antioxidante

Según Cerrón (2012) manifiesta que la actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres. Existen antioxidantes naturales contenidos en los alimentos y también sintéticos; los antioxidantes naturales que pueden ser hidrosolubles y liposolubles. Estos antioxidantes son los encargados de retrasar los procesos oxidativos y así ayudar a evitar el envejecimiento celular. Estos actúan ya sea evitando la formación de radicales libres, reaccionando con otros

radicales o secuestrando a las moléculas de oxígeno, evitando así el comienzo de las reacciones oxidativas en el interior de la célula.

Según Díaz (2009) el proceso oxidativo empieza con la formación de radicales libres; éstos son moléculas con un electrón desapareado altamente reactivas que pueden ser generadas de forma endógena (metabolismo de la respiración, células fagocitarias, autoxidación de compuestos de carbono y la activación catalítica de algunas enzimas) y exógena (radiación, luz solar, tabaco, ozono, drogas, contaminantes y aditivos en alimentos) y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxilos. Son capaces de favorecer reacciones en cadena muy dañinas para el organismo, desencadenando un fenómeno conocido como estrés oxidativo, y éstas reaccionar con componentes celulares importantes como el ADN o las membranas y afectar la estructura y función de algunas proteínas y lípidos. En la Figura 4, se observa que la función antioxidante se da por el resultado de ceder electrones desde una molécula hacia otra con un radical libre permitiendo que este se vuelva un radical débil al disminuir su actividad oxidante, lo que elimina la actividad tóxica para el organismo.

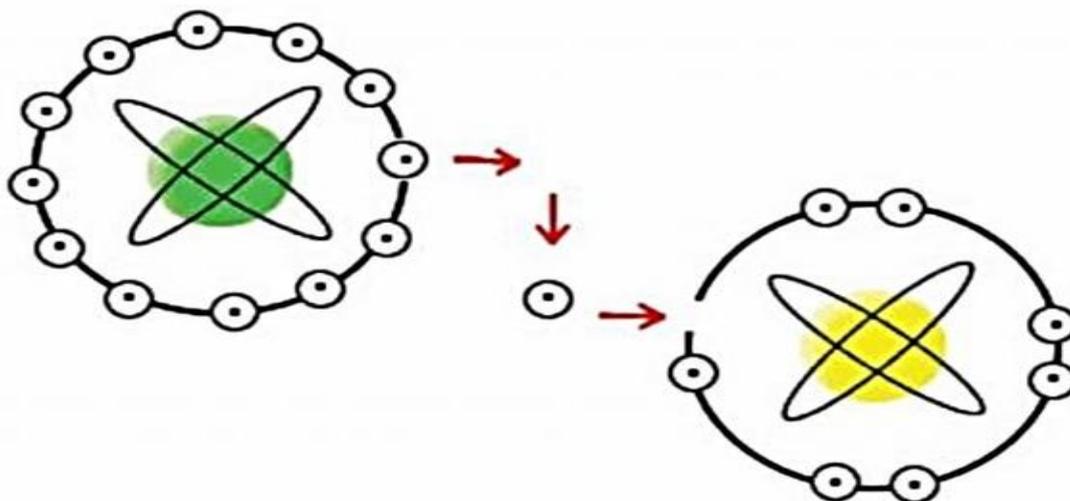


Figura 4. La función antioxidante

Fuente: Criado y Moya (2009).

Los mecanismos de acción de los antioxidantes se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Mecanismos de acción de los antioxidantes.

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidante
Antioxidante propiamente dicho	Inactivando radicales libres lipídicos.	Compuestos fenólicos
Estabilizadores de hidroperóxidos	Previnendo la descomposición de hidroperóxidos en radicales libres.	Compuestos fenólicos
Sinergistas	Promoviendo la actividad de los antioxidantes propiamente dichos.	Ácido cítrico, ácido ascórbico
Quelantes de metales	Ligando metales pesados a compuestos inactivos.	Ácido fosfórico, compuestos de Maillard, ácido cítrico
Sustancias que reducen hidroperóxido	Reduciendo hidroperóxidos por vías no radicalarias.	Proteínas aminoácidos

Fuente: Fernández (2011).

Según Fernández (2011) los principales compuestos que tienen actividad antioxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, pigmentos, y sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y los cofactores (Cu, Zn, Mn, Fe y Se). El contenido de estos compuestos en los vegetales queda

determinado por numerosos factores, entre los que se pueden mencionar: la especie, variedad, condiciones de cultivo y maduración. En general, la actividad antioxidante aumenta cuando existen grupos hidroxilo o grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto, por otra parte, la eficiencia de un antioxidante está relacionada con la energía de activación, las constantes de velocidad, el potencial oxido reducción, la facilidad con la que se puede destruir o perder el antioxidante, y su solubilidad.

Según Fernández (2011) señala que la acción antioxidante presente en plantas es importante debido a que puede ayudar a las personas a combatir enfermedades crónicas, como la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), enfermedades cardiovasculares, daño oxidativo al ADN, cáncer, enfermedades cardiovasculares y alteración de la visión; por otra parte, los radicales libres no son intrínsecamente malos, de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus, regulan la estructura y función de las proteínas, controlan el tono muscular y otros beneficios. Estos radicales libres producidos por el cuerpo, son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema, con este fin, nuestro cuerpo produce unas enzimas (como la catalasa o la dismutasa) que son las encargadas de neutralizarlos. Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para la salud, el problema para nuestra salud se genera cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos que penetran en nuestro cuerpo acelerando con rapidez el envejecimiento y degeneración de nuestras células. Hoy está plenamente demostrada la influencia de los radicales libres en el origen y desarrollo de casi todas las enfermedades que afectan al ser humano y a los animales tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, afecciones inmunitarias y otras. Se han realizado estudios para determinar la capacidad antioxidante de diferentes tubérculos como la papa, oca, mashua y zanahoria y entre otros.

2.1.4.1. Clasificación de los antioxidantes

Según Valdebenito (2005) menciona que los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofílicos) o en lípidos (hidrofóbicos). En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos.

Según Pokorny *et al.* (2001), señalan que los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de un cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de la radiación UV o desactivación del oxígeno singulete. Normalmente, los antioxidantes secundarios solo poseen actividad antioxidante en presencia de un segundo componente minoritario, lo cual puede observarse en el caso de agentes secuestradores, tal como el ácido cítrico, que sólo es efectivo en presencia de iones metálicos, y agentes reductores tal como el ácido ascórbico que sólo es efectivo en presencia de tocoferoles u otros antioxidantes primarios.

Según Ruíz (2009) los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales los antioxidantes actúan: Mecanismos enzimáticos, se trata de enzimas que proporcionan una función protectora frente a los oxidantes biológicos, disminuyendo la concentración intracelular de radicales libres. Entre ellas destacan la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH- quinona oxidoreductasa y la epóxido hidrolasa entre otras. Las enzimas descritas constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo.

- **Antioxidantes naturales**

Según Flores (2000) señala que los antioxidantes, son un grupo amplio de compuestos: vitaminas, compuestos fenólicos, minerales, colorantes naturales y enzimas. Muchos de los antioxidantes se encuentran en alimentos vegetales, por lo que se recomienda con efecto beneficioso incluir frutas, legumbres, tubérculos, verduras y hortalizas o cereales integrales en nuestra dieta. Se dice que los alimentos tienen propiedades antioxidantes cuando son capaces de neutralizar la acción oxidante de una entidad molecular inestable, los radicales libres, sin perder su propia estabilidad electroquímica. Millones de radicales libres bombardean diariamente nuestras células. El hecho de que necesiten tantos años para causar daños mayores se debe a la eficacia homeostática de los sistemas enzimáticos que produce nuestro propio organismo para neutralizarlos. Nuestro sistema de protección inmunitaria está luchando contra los radicales libres en todo momento. El problema para el organismo humano se produce cuando tiene que tolerar de forma continua un exceso de radicales libres, los cuales aparte de ser producidos por el metabolismo normal son generados por varios factores que actúan sobre o penetran en nuestro cuerpo. Las tensiones sociales, las presiones políticas y emocionales, la contaminación ambiental, la polución industrial y acústica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas, el consumo de ciertas grasas, etc., son algunos de los factores que incrementan excesivamente la generación de radicales libres. Este exceso supera la 30 resistencia (capacidad de reponer su homeostasis) metabólica y no puede ser eliminado por el organismo. Los radicales libres no sólo dañan las membranas de las células, sino que llegan a destruir y mutar la información genética de las células (ácidos nucleídos), facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades. La acción de los radicales libres está ligada al cáncer así como al daño causado en las arterias por el colesterol "malo" LDL (Low Density Lipoprotein Cholesterol), lo que relaciona directamente a las especies reactivas con las enfermedades cardiovasculares.

Según Flores (2000) señala que los antioxidantes ceden a los radicales libres sus propios electrones salvando así nuestras células de

sufrir daño. Entre los antioxidantes por excelencia encontramos al β -caroteno, la vitamina C, la vitamina E, y el selenio.

- **Antioxidantes sintéticos**

Según Frankel *et al.* (1996), manifiestan que se han desarrollado una gran cantidad de antioxidantes sintéticos lo más usados son los compuestos fenólicos como hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), la butilhidroquinona terciaria (TBHQ) y los ésteres del ácido gálico. Los antioxidantes sintéticos contienen sustituciones alquílicas para mejorar su solubilidad en grasas y aceites. Son muy estables al calor y se usan a menudo para estabilizar las grasas de los productos cocinados y fritos. Pero desde el punto de vista de la seguridad alimentaria están sujetos a constantes cuestionamientos y restricciones dado a que se ha reportado que serían carcinogénicos de acuerdo a las normas el uso de estos cuatro antioxidantes sintéticos está limitado al 0.02% del contenido de grasa o aceite del alimento para suprimir el desarrollo de peróxidos durante el almacenamiento. La toxicología de los antioxidantes sintéticos se ha estudiado con gran profundidad, aconsejan mantener cierta precaución. En este caso los antioxidantes naturales se presentan como sustancias más saludables

2.1.4.2. Usos de los antioxidantes en alimentos

Según Scalbert y Williamson (2000) los antioxidantes se utilizan como los aditivos alimenticios para ayudar a preservar los alimentos. La exposición al oxígeno y la luz del sol son los dos factores principales que causan la oxidación de alimentos, así que el alimento es preservado manteniéndolo en la oscuridad y sellándolo en envases o aun cubriéndolo en cera, como con los pepinos. Sin embargo, como el oxígeno es también importante para la respiración de la planta, almacenar los materiales de planta en condiciones anaerobias produce sabores y colores desagradables. Que los niveles de compuestos antioxidantes pueden variar considerablemente dentro de la misma especie vegetal, e incluso entre sus variedades, debido a factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad del cultivo.

2.1.4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante

- **Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)**

Según Brand-Willams (1995) manifiesta que el método se basa en la reducción de la absorbancia medida del radical DPPH, por antioxidantes; que consiste en la medida de la absorbancia del radical DPPH, disuelto en metanol. La concentración de DPPH es el medio de reacción que se calcula a partir de una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08 - 1,28 mM en disolución de metanol se ensaya en las mismas condiciones.

Según Inostroza *et al.* (2015), la actividad antioxidante o capacidad antioxidante por DPPH en mashua exequivalente a Trolox ($\mu\text{mol TE/g}$ peso muestra) fueron: $14,2 \pm 0,2$ (30 min) y $15,8 \pm 0,3$ (60 min).

- **Método ABTS (Ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)**

Según Kuskoski *et al.* (2005), el radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico, la concentración final incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0 - 15 μM en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0 - 20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C).

Según Inostroza *et al.* (2015), mencionan que la actividad antioxidante por ABTS en mashua exequivalente a Trolox ($\mu\text{mol TE/g}$ peso muestra) fueron $16,3 \pm 0,2$ (1 min) y $17,0 \pm 0,2$ (7min).

2.1.5. Ácido ascórbico

Según Rojas (2008) la vitamina C está formado por seis átomos de carbono. Es un componente nutricional importante de la alimentación, su actividad se da por la unión del ácido L-ascórbico y su forma oxidada es el ácido deshidroascórbico, la vitamina C es el antioxidante más importante para evitar la peroxidación lipídica es de origen hidrosoluble permitiendo regular los procesos oxidativo dentro de la célula evitando así el envejecimiento celular impidiendo la formación de radicales libres. Y al no poder ser sintetizado dentro del organismo humano tiene que ser ingerido a través de los diferentes tipos de alimentos afirman que existen diversas fuentes de ácido ascórbico como frutas cítricas, vegetales y patatas que son de fácil deterioro a pesar de mantenerse almacenados en espacios cerrados. La ausencia de dicha vitamina produce la enfermedad conocida como escorbuto que se presenta en forma de sangrado de encías, moretones en la piel y problemas musculares que pueden llegar a producir la muerte, por eso la importancia de su consumo en bajos niveles. Se ha determinado que en la mashua existe aproximadamente 77,37 mg de vitamina C por cada 100 g de materia fresca, lo que le hace unos de los tubérculos con mayor contenido de ácido ascórbico determinaron que al momento de aplicar un tratamiento térmico a altas temperaturas en varios tipos de alimentos como frutas, vegetales y tubérculos, el ácido ascórbico tiende a destruirse, también por procesos de lixiviación presentados en escaldados, provocando que las concentraciones de vitamina C sé reduzcan., mencionan que los escaldados de diferentes variedades de papa detuvieron un 54% de la concentración inicial de ácido ascórbico a diferencia de procesos de horneado y microondas que ocasionaron menor retención de vitaminas.

2.1.6. Colorantes

Según Brennan (2008) señala que el color y su uniformidad son componentes importantes en la calidad visual de los alimentos frescos y tienen un papel trascendental en la elección del consumidor el momento de comprar. La industria alimentaria con el objetivo de obtener productos que presentan los colores propios de los alimentos frescos o para presentar productos más llamativos para los consumidores utiliza colorantes naturales o artificiales.

2.1.6.1. Clasificación de los colorantes

Según Quintero *et al.* (2002), existen diversas maneras de clasificar a los colorantes, con base en su naturaleza u origen (naturales o artificiales), por su grupo cromóforo (radical que le confiere un determinado color), en el cuadro 8 se muestran la clasificación de los colorantes.

Cuadro 8. Clasificación de los colorantes

Colorantes			
Naturales			Sintéticos
Orgánicos		Inorgánicos	Orgánicos
Vegetales	Animales	Minerales	componentes
Antocianinas	Acido cármico	Azul ultravioleta	Antraquinona
Betalainas	Acido kermésico	Dióxido de titanio	Azo
Carotenoides	Otros	Negro carbón	otros
Flavonoides			
Clorofila			
Otros			

Fuente: Quintero *et al.* (2002).

2.1.6.2. Métodos de extracción de colorantes

- **Extracción por método Soxhlet**

Según Castillo y Ramírez (2006) mencionan que la extracción de colorante por el método de Soxhlet es uno de los métodos que consiste específicamente en extraer el colorante utilizando un equipo llamado Soxhlet, que para su completa extracción del colorante se procede a reflujar a una temperatura no mayor de 60°C. Se utiliza diferentes solventes como son: Agua destilada, alcohol etílico, entre otras combinaciones.

- **Extracción por método de maceración**

Según Castillo y Ramírez (2006) mencionan que el método de extracción por maceración consiste específicamente en dejar reposar por 14 días en un lugar fresco y protegido a los frascos tapados para su posterior filtración y envasado. Se utiliza diferentes solventes como agua y alcohol etílico.

- **Obtención del colorante de mashua**

Según Yong y Howar (2003) los tubérculos (4 kg) son triturados y homogeneizados con una solución de extracción de ácido clorhídrico 1,5 N y etanol al 96% (15:85, v/v), siendo la proporción de sólido a disolvente de (1:2, p/v). La mezcla obtenida se pone en maceración por 72 horas a 4°C, en un frasco de color ámbar, con agitación diaria, posterior filtración y concentración en un evaporador rotatorio a 40°C. Obtenido el extracto se colocó en tubos ámbar y se almacenó a -18°C en atmósfera de nitrógeno.

2.2. ANTECEDENTES

Según Inostroza *et al.* (2015), en la investigación “Actividad antioxidante de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) y su aplicación como colorante para yogur” tuvieron como objetivo evaluar la actividad antioxidante y uso del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) como colorante para yogur. La actividad antioxidante se determinó por los métodos DPPH y ABTS. El contenido total de antocianinas (AT) y polifenoles (PT) fue determinado por el método de pH diferencial y Folin-Ciocalteu, respectivamente. Los parámetros del sistema CIEL*a*b* se utilizaron para medir el color morado y la concentración de pigmento empleado para colorear el yogur natural “3500”, comparándose con yogur comercial de mora “6224”, que fue tomado como referencia. Ambas muestras de yogur se almacenaron bajo condiciones de refrigeración (4°C ± 1) durante 28 días; se les midió color y pH cada 4 días. Para el análisis sensorial se aplicó la prueba de aceptación (p<0,05). El contenido de AT y PT en los extractos analizados fueron 192,63 ± 1,28 mg de cianidina-3-glucósido/100g peso fresco (PF) y de 314,12 ± 1,23 mg de ácido gálico/100g PF, respectivamente. La capacidad antioxidante equivalente al trolox obtenida fue de 15,8 ± 0,2 µmol/g PF, aplicando el ensayo DPPH, y 17,0 ± 0,2 µmol/g PF con ABTS. El extracto se adicionó al yogur natural (1,2 mg/100 g) impartiendo un color morado similar al del yogur comercial de mora con mínimos cambios del color que no fueron visualmente evidentes; el yogur “3500” fue significativamente el preferido por los jueces frente al yogur “6224”. Se concluye que los pigmentos extraídos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz &

Pavón, poseen actividad antioxidante, presentándose como una alternativa de colorante aplicable en alimentos de acidez intermedia como el yogur.

Según Gorriti *et al.* (2009), extracción de antocianinas de las corontas de *zea mays l.* "maíz morado"; en el presente trabajo se investigaron las condiciones óptimas de extracción de antocianinas de las corontas del maíz morado mediante el empleo de un diseño completo al azar con arreglo factorial 2A3B4C4D. Los factores estudiados fueron pH, solvente, tiempo y temperatura, el maíz morado crece mejor y presenta mayor contenido de antocianinas de 1500 hasta los 2800 msnm. Los resultados mostraron antocianinas entre 8,404 y 47,984 mg/g de coronta, determinados según el método de pH diferencial.

Según Martínez (2015) en la investigación "Técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas en materias primas de la región de Ayacucho" Ayacucho- Perú, menciona la identificación de antocianina se determinó por el método diferencia de pH conocido como espectrofotometría por pH diferencial, que es un método espectrofotométrico rápido y sencillo basado en la antocianina estructural, en la transformación que se produce con un cambio en el pH. La preparación de la muestra para el análisis espectrofotométrico se fundamenta en la extracción de antocianina de la muestra, para lo cual se realizó colocando 5 g de la muestra (%H conocida) con 200 mL de solución etanólica al 80 %, acidificado con HCl (pH = 2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos y luego se filtró, recolectando con cuidado el extracto. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y por el mismo tiempo, seguidamente se filtra y colecta el extracto. Los filtrados o extractos fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL, enrasándose al volumen de la fiola utilizando la solución etanólica. Para la evaluación espectrofotométrica se utilizó dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1 , O (0,025 M) y ácido clorhídrico/acetato de sodio de pH 4,5 (0,4 M). Luego, se toma una muestra o alícuota del extracto y se diluye apropiadamente (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,2 a 1,4 medidos a 520 nm); por decir, para 1 mL de una muestra o extracto se añade 24 mL de la correspondiente solución tampón (que sería un factor de

dilución de 25) y se mide la absorbancia en un Espectrofotómetro Genesys 6, frente a un blanco a 520 y 700 nm.

Según Mamani y Arias (2011) en la investigación “Antocianina, polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clases de papa nativa del genero *Solanum* de pilpa azul y rojo” determinaron el efecto de pH (3.0, 4.0) y solvente (acetona, etanol) en la extracción sobre el contenido de antocianina, de acuerdo a los resultados del análisis estadístico realizado para ambos clones indica que existen diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05 en el contenido de antocianinas entre los dos solventes, sin embargo existe diferencia significativa en el pH para el clon 304239 y no así para el clon 303851. El contenido de antocianinas presentes en el clon 304239 y clon 303851 fueron 0.8044 y 0.1683 mg Cy-3- glu/ g MF respectivamente. Se determinó la capacidad antioxidante a una Concentración Inhibitoria del 50% (ICSO%), el clon 304239 (27.52 ug/ml) mostró menor concentración que el clon 303851 (76.15 ug/ml), dado que cuanto menor es el valor de ICSO mayor es el poder antioxidante. Los compuestos funcionales responsables de esta actividad antioxidante en las papas nativas son los ácidos fenólicos, e flavonoides, antocianinas, ácido ascórbico, carotenoides y tocoferoles.

Según Taipe (2017) en la investigación “Fenoles totales y actividad antioxidante en mashua (*Tropaeolum Tuberosum*) en estado fresco, soleado y cocido de las variedades amarillo zapallo y negra” determinó el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes hidrofílica de dos variedades de mashua: Amarilla Zapallo y Negra, que fueron provenientes del distrito de Cullhuas, en tres estados: fresco, soleado (exposición al sol por 7 días) y cocido (mashuas Soleados y cocidas por 15 minutos). El análisis fisicoquímico realizado, varió notablemente entre el estado fresco, soleado y cocido, encontrándose un aumento de los componentes en el estado soleado en las dos variedades. En cuanto al pH de las dos variedades aumentaron luego del soleado y la cocción, a diferencia de la acidez titulable que disminuyó El contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante ensayados variaron notablemente entre las dos variedades, encontrándose valores altos en la mashua negra, pero presentó diferencias significativas entre los diferentes

estados, en el contenido de fenoles totales se encontró valores de 17,43; 18,60 y 16,65 mg de ácido gálico/g en el estado fresco, soleado y fresco respectivamente y en la capacidad antioxidante se obtuvo 109,24; 114,50 y 111,20 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.) en el estado fresco, soleado y fresco respectivamente. De acuerdo análisis estadístico realizado mostro que la mashua Soleado presentó valores altos de los componentes anteriormente mencionados, en ambas variedades; presentando un incremento el en contenido de fenoles totales en 20,83 % para la variedad amarillo zapallo y 9,37 % para la variedad negra después del soleado, pero posteriormente al tratamiento térmico, se apreció una disminución del 16,77% para la variedad amarillo zapallo y 10,48%, para la negra. En cuanto a este compuesto bioactivo, se aprecia que después de haber recibido los dos tratamientos, la mashua cocida y fresca no presenta diferencias significativas (los contenidos son iguales desde el punto de vista estadístico). En cuanto al valor de la capacidad antioxidante, esté fue afectado por el soleado y la cocción en ambas variedades, en la variedad amarillo zapallo se evidenció un aumento durante el soleado de 5,45 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.) y una ligera disminución de 1,37 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.) después de someterlo a cocción, en la variedad negra hubo un incrementó de 5,26 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.) durante el soleado y una disminución de 3,67 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.) después de la cocción.

Según Pinedo (2015), en la investigación “Niveles de fertilización en dos variedades de maíz morado (*Zea Mays. L*) en la localidad de Canaán-Ayacucho” la evaluación del contenido de antocianinas, de dos variedades de maíz morado INIA-615 y PMV-581, no existio diferencias significativas; las antocianinas se obtienen o son mejores a altitudes comprendidas entre 1000 a 2900 msnm.

2.3. HIPÓTESIS

2.3.1. Hipótesis general

- El contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) está influenciado por la altitud donde es cultivada.

2.3.2. Hipótesis específicos

- La caracterización físico química en mashua negra varía de acuerdo a la altitud donde es cultivada.
- El contenido de los compuestos bioactivos en mashua negra varía de acuerdo a la altitud donde es cultivada.
- El contenido de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra varía de acuerdo a la altitud donde es cultivada.
- El rendimiento de colorante en mashua negra varía de acuerdo a la altitud donde es cultivada.

2.4. VARIABLES

2.4.1. Variable independiente

X1: La altitud donde es cultivada la mashua negra

2.4.2. Variable dependiente

Yi: El contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra.

2.4.3. Operacionalización de variables

En el cuadro 9, se muestran las variables, dimensiones e indicadores, para el estudio en el desarrollo de la investigación.

Cuadro 9. Operacionalización de las variables para el estudio.

Variables	Dimensiones	Indicadores
<p>Independiente</p> <p>La altitud donde es cultivada la mashua negra.</p>	<p>– La medición de la altitud utilizando GPS. En los lugares indicados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 4039 msnm (M1) • 3814 msnm (M2) • 3463 msnm (M3)
<p>Dependiente.</p> <p>Contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra.</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Extracción y cuantificación de antocianinas totales (método pH diferencial). – Polifenoles totales por método de Azul de prussian. – Actividad antioxidante por DPPH y ABTS. – Vitamina C, por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia. – IC50 DPPH y ABTS – Rendimiento de colorante en mashua negra. 	<ul style="list-style-type: none"> • mg de cianidina-3-glucósido/g de muestra (antocianinas) • ug de AGE/g de muestra (polifenoles totales) • mg TE/g de muestra (DPPH y ABTS) • ug AA/g de muestra (vitamina C) • g/ml de muestra • % (v/p)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo al tipo de investigación pertenece a la investigación experimental, prospectiva, longitudinal y analítica; y de acuerdo al nivel de investigación pertenece a la investigación aplicada y explicativa.

3.2. LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN

La parte experimental, prospectivo, longitudinal y analítico se realizó en los laboratorios de Análisis físico químico y análisis por instrumentación de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial – Facultad de Ciencias Agrarias de la “Universidad Nacional Hermilio Valdizán” durante el periodo comprendido entre Abril a Setiembre del año 2018.

3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

3.3.1. Población

La Población fueron las mashuas negras (*Tropaeolum tuberosum*.) cultivada en tres altitudes diferentes, pertenecientes a la región HUÁNUCO.

3.3.2. Muestra

La obtención de las muestras fueron tomadas a tres altitudes de la región Huánuco; el primero de ellos M1 a 4039 msnm con número de punto 1099 perteneciente al C.P San Joaquín-San Rafael-Ambo (pH:7,2; T°:5°C; Presion:16,9 in Hg; Humedad:74%; suelo: húmífero o de tierra negra; piso ecológico: piso páramo), el segundo M2 a 3814 msnm con número de punto 1102 perteneciente a Ayapiteg-Chavinillo (pH:4,8; T°:9,6°C; Presion:17,8 in Hg; Humedad:59%; suelo: suelo limoso; piso ecológico: piso páramo) y el tercero M3 a 3463 msnm con número de punto 1109 perteneciente al distrito de Sillapata-Dos de Mayo(pH:5,9; T°:11,68°C; Presion:19,8 in Hg; Humedad:42%; suelo: húmífero ; piso ecológico: piso páramo). Para todo ello se utilizó GPS navegador marca GARMIN modelo ETREX20X.

La muestra lo conformaron 10 kg de mashua negra recolectadas a diferentes altitudes de la región Huánuco; por cada altitud aprox. 3,300 kg de muestra; los mismos que ha sido asignados, 2 kg por cada muestra con lo que se realizó el rendimiento de colorante haciendo un total de 6 kg para dicha operación y el resto pues en la evaluación del contenido de antocianinas, polifenoles totales, actividad antioxidante (DPPH y ABTS) y Vitamina C.

3.3.3. Unidad de análisis

Las unidades de análisis fueron el contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra cultivado en tres altitudes de la región Huánuco.

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

En el cuadro 10, se aprecian las muestras que fueron tomadas a diferentes altitudes y lugares de la región Huánuco, para su estudio correspondiente.

Cuadro 10. Ubicación de las muestras de la mashua negra a diferentes altitudes.

Muestras (M)	Altitud (msnm)	N° de punto	Lugar
M1	4039	1099	C.P San Joaquín-San Rafael-Ambo- Huánuco.
M2	3814	1102	Ayapiteg- Chavinillo- Yarowilca- Huánuco.
M3	3463	1109	Sillapata- Dos de Mayo- Huanuco.

Los tratamientos para el desarrollo de la investigación, fueron tres: agua, alcohol puro 96° y agua más alcohol puro 96°, estos a diferentes concentraciones o volúmenes (ml). En el cuadro 11 se aprecian los tratamientos que fueron utilizados para el desarrollo de la investigación.

Cuadro 11. Tratamientos para extraer los principios activos

Tratamientos	Descripción	Porcentaje (%)
T1	Agua	100
T2	Alcohol puro 96°	100
T3*	Agua y alcohol puro 96°	50:50

* Se trabajó con el tratamiento tres para el caso de polifenoles y actividad antioxidante.

La extracción de antocianinas, se realizó empleando tres tratamientos, como se observa en el cuadro 12, siendo: agua, alcohol puro 96° y agua más alcohol puro 96°, estos a diferentes concentraciones o volúmenes.

Cuadro 12. Extracción de antocianinas empleando los tres tratamientos.

Tratamientos	Descripción	% H₂O	% Etanol
T1	50 ml de Agua	100	-
T2	50 ml de Alcohol puro 96°	4	96
T3	25 ml de Agua y 25 ml de Alcohol puro 96°	50	50

La actividad antioxidante por DPPH y ABTS (IC₅₀), frente a extractos acuoso y etanólico en mashua negra, se trabajó bajo factores de dilución como fueron: FD 5, FD 10 y FD 15; en el cuadro 13 se muestran la preparación de las muestras concernientes a la actividad antioxidante, en función al coeficiente de inhibición (IC₅₀), se realizó empleando el tratamiento tres.

Cuadro 13. Preparación de muestras para actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS empleando tratamiento tres.

Muestras (M)	Factor de dilución	Preparación de muestra
M1	FD 5	200 µl m y 800 µl de agua + alcohol 96°
	FD 10	200 µl m y 1800 µl de agua + alcohol 96°
	FD 15	200 µl m y 2800 µl de agua + alcohol 96°
M2	FD 5	200 µl m y 800 µl de agua + alcohol 96°
	FD 10	200 µl m y 1800 µl de agua + alcohol 96°
	FD 15	200 µl m y 2800 µl de agua + alcohol 96°
M3	FD 5	200 µl m y 800 µl de agua + alcohol 96°
	FD 10	200 µl m y 1800 µl de agua + alcohol 96°
	FD 15	200 µl m y 2800 µl de agua + alcohol 96°

3.5. PRUEBA DE HIPOTESIS

Hipótesis nula

- **H₀:** La caracterización físico química en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco son iguales.

$$H_0: \mu_{M1} = \mu_{M2} = \mu_{M3} = 0$$

- **H₀:** El contenido de los compuestos bioactivos en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco, presentan iguales concentraciones.

$$H_0: \mu_{M1} = \mu_{M2} = \mu_{M3} = 0$$

- **H₀:** El contenido de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco presentan iguales concentraciones.

$$H_0: \mu_{M1} = \mu_{M2} = \mu_{M3} = 0$$

- **H₀**: El rendimiento de colorante en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco son iguales.

$$H_0: \mu_{M1} = \mu_{M2} = \mu_{M3} = 0$$

Hipótesis alternativa

- **H₁**: Al menos una de las muestras presenta diferente caracterización físico química en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq 0$$

- **H₁**: Al menos una de las muestras presenta diferentes concentraciones de compuestos bioactivos en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq 0$$

- **H₁**: Al menos una de las muestras presenta diferentes concentraciones de actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq 0$$

- **H₁**: Al menos una de las muestras presenta diferente rendimiento de colorante en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq 0$$

3.5.1. Diseño de la investigación

Para el análisis estadístico sobre el contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina c y rendimiento de colorante en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco, se utilizó ANOVA (análisis de varianza), para un diseño completamente al azar DCA y para comparar las muestras; para aceptar

o rechazar las hipótesis nulas se utilizó la prueba Tukey ($\alpha=5\%$) un nivel de confianza del 95%(0,95).

El Modelo Aditivo Lineal (MAL) para el diseño completamente al azar (DCA) que se utilizó fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina C y rendimiento de colorante en mashua negra de la j-ésima repetición sometida al i-ésimo tratamiento.

μ = Es el efecto medio

T_i = Es el efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error experimental.

3.5.2. Datos a registrar

Los datos registrados durante el desarrollo de la investigación en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco, fueron los siguientes:

- **Caracterización fisicoquímica**

Se registraron los análisis fisicoquímicos como pH, acidez titulable, sólidos solubles, grasa, humedad y cenizas.

- **Contenido de antocianinas**

Se registraron el contenido de antocianinas expresados en mg de cianidína-3-glucósido/g de muestra.

- **Contenido de polifenoles totales**

Se registraron el contenido de polifenoles totales expresados en ug AGE/g de muestra.

- **Evaluación de actividad antioxidante por DPPH y ABTS**
Se registraron el contenido de actividad antioxidante por DPPH y ABTS expresados en mg TE/g

- **Contenido de vitamina C**
Se registraron el contenido de vitamina C o ácido ascórbico expresados en ug AA/g

- **Rendimiento de colorante en mashua negra**
Se registró el rendimiento de colorante expresados en % (v/p).

3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información

Los datos para el trabajo de investigación se anotaron en un cuaderno de campo, se realizaron apuntes de todos los viajes que se realizó para encontrar las muestras, que fueron tomadas o georreferenciados a diferentes altitudes de la región Huánuco.

Se realizaron entrevistas a los ciudadanos, a aquellas personas que sembraron la mashua negra. Se consultaron libros y tesis en la biblioteca central de la UNHEVAL, además se recolectaron informaciones de tesis virtuales, artículos científicos, documentales.

Se Trabajó en los laboratorios de análisis por instrumentación, fisicoquímicos; los datos se registraron en fichas de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán (laboratorio), así mismo para guardar las informaciones se utilizaron instrumentos como memorias, USB, CDs y otros medios de almacenamiento, los datos se apuntaron en cuaderno de campo.

Para el procesamiento de la información o análisis estadístico, se utilizaron programas como Excel 2013 y STATGRAPHICS Centurion.

3.6. MATERIALES Y EQUIPOS

3.6.1. Materia prima

La mashua negra utilizada, durante el trabajo de investigación fue tomada a diferentes altitudes de la región Huánuco, entre ellos la primera muestra a 4039 msnm ubicado en el C.P. San Joaquín-San Rafael-Ambo; la segunda a 3814 msnm ubicado en Ayapiteg-Chavivillo-Yarowilca y la tercera muestra a 3463 msnm ubicado en el distrito de sillapata-Dos de Mayo.

3.6.2. Materiales

Tips de 200 μ l, 1000 μ l; cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1,5 ml; pliegos de papel filtro; racks para tips de 2-200 μ l, 100-1000 μ l; filtros de jeringa PVDF hidrofílico de 0,22 μ m; papel tissue; rollos de papel toalla, lentes de seguridad; buretas de 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml; fioles de 100, 500 y 1000 ml; vasos de precipitación de 100, 250, 500 y 1000 ml; matraces de 250 ml; matraz quitazato; placas Petri, embudos de vidrio, tubos de ensayo, gradillas, pinzas, crisoles, morteros, campanas, balones.

3.6.3. Equipos

- Espectrofotómetro UV/VIS-GENESYS 10S UV-VIS-Thermo Scientific.
- Centrífuga modelo Rotina 380 (hettich zentrigen) velocidad máxima de 15000 rpm.
- Centrífuga mini spin plus-eppendorf.
- Equipo de baño maría con agitación-GFL 1083-0037.
- Horno mufla, select-horn-H.W.K eccel S.A.
- Extractor soxhlet
- Refractómetro, ABBE type refractometer AR 12- SCHMIDT & HAENSCH S/N 33633.
- Potenciómetro pHmetro SI Analytics-handylab pH 11.
- Homogeneizador de soluciones VORTEX-Turbo Mixer
- Cámara de conservación de productos y muestras.

- Balanza analítica OHAUS-Adventurer –TM exactitud de 0.0001 g
- Balanza analítica M-power –sartorius, 0.0001 g.
- Cocina eléctrica de 4 hornillas, Gerhardt, Cimatec S.A.C.
- Estufa ECOCELL, temperatura máxima de 250°C, tipo/modelo, LSIS-B2V/EC 55, del año 2017.
- Bomba de vacío-PALL-Life Sciences, modelo POA-P730-BN.
- Equipo ultrasonido, Lab Companion.
- Equipo HPLC para la determinación de Ácido ascórbico, marca Knauer.
- Micropipetas de 20-200 ul, 100-1000ul-ISOLAB.

3.6.4. Reactivos

- Alcohol puro 96°, marca Chemilab/Nacional.
- Éter de petróleo 1L; marca TEDIA –Petroleum Ether 35-60°C-USA.
- HCL 0.2 M, HCL 1M; HCl (36,36; 37%; 1,19 g/mL).
- Ácido meta fosfórico 50 g; marca Spectrum
- 1L metanol, marca Chemilab/Nacional
- Persulfato de potasio QP, marca Chemilab / Nacional
- Cloruro de hierro hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), marca Riedel – de Haen.
- Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), marca Riedel – de Haen.
- Ácido acético, marca J.T.Baker (99.9%).
- Fenolftaleína, marca EMSURE MERCK.
- NaOH 0,1 N, marca EMSURE MERCK
- HCL 0,5 N, (37%)
- Ácido L-ascórbico (estándar), marca Scharlau.
- 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH); marca Sigma Aldrich.
- (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox); marca Sigma Aldrich.
- 2,2–azinobis–3– etilenbenzotiazolino-6–ácido sulfónico) (ABTS⁺); marca Sigma Aldrich.
- Ácido gálico, marca EMSURE MERCK.

3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de la investigación, estuvo enfocado en la evaluación del contenido de antocianinas, polifenoles totales, vitamina c y rendimiento de colorante en mashua negra cultivado en tres altitudes de la región Huánuco, se agrupó en cuatro grupos o etapas para el desarrollo de la investigación, a continuación se detalla el esquema experimental que se desarrolló, como se muestra en la figura 5.

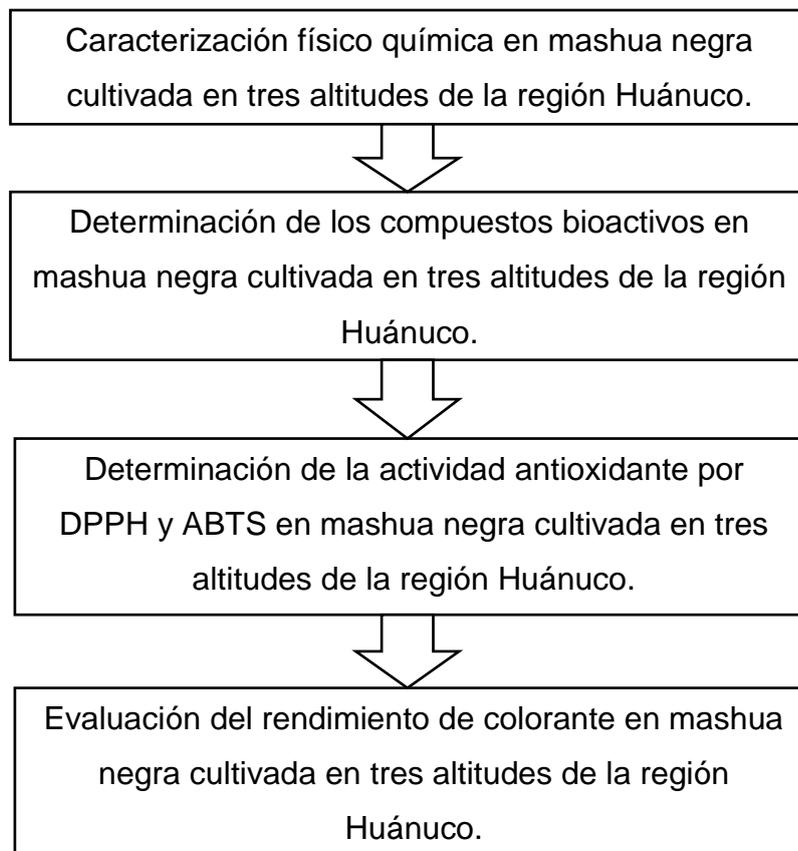


Figura 5. Exquema esperimental de la investigación

3.7.1. Caracterización físico química en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco

La caracterización física química en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) se realizó en base a las normas AOAC (Métodos Oficiales de Análisis, Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) los siguientes análisis:

- **pH:** Se realizó la medición del pH, de acuerdo al método de la AOAC (1997), triplicado por cada muestra, utilizando el equipo de potenciómetro.
- **Acidez titulable:** Se midió la acidez titulable por el método potenciométrico de la AOAC (2005), triplicado por cada muestra y se expresó en g AA/ g de muestra. La determinación se hizo por titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio 0,1 N hasta llegar un pH de 8.
- **Sólidos solubles (° Brix):** Se midió los sólidos solubles con la ayuda de un refractómetro, triplicado por cada muestra. Se realizó por el método de la AOAC (2000).
- **Grasa:** Se realizó la extracción de grasa por el método de extractor soxhlet, empleando el método de la AOAC (2000) y se expresó en porcentaje, triplicado por cada muestra.
- **Humedad:** Se determinó por el método de la AOAC (2000), a través de la pérdida de peso que sufre la muestra por calentamiento, hasta obtener peso constante y se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de pesos.
- **Cenizas:** Se realizó por el método de la AOAC (2000), por incineración de la muestra a 550°C por 4 horas para quemar todo el material orgánico.

3.7.2. Determinación de los compuestos bioactivos en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco

3.7.2.1. Cuantificación de antocianinas totales por el método del pH diferencial

La cuantificación de antocianinas totales se realizó por el método de pH diferencial descrito por; Rapisarda *et al.* (2000), cuya metodología fue la siguiente:

a. Preparación de soluciones

1. **Buffer pH = 1,0:** 125 mL de 0,2 M KCl y 375 mL de 0,2 M HCl.

2. **Buffer pH = 4,5:** 400 mL de 1 M CH₃COONa, 240 mL de 1 M HCl y 360 mL H₂O

Nota: Se verificó el pH de los buffers

b. Preparación de los extractos

Se pesó 5 g de muestra de mashua negra rayada, se trabajó con tres tratamientos siendo:

T1=50 ml de agua, T2=50 ml de alcohol 96° y T3=25 ml de agua+25ml de alcohol 96°.

M1: P1=5,0154 g; P2=5,0039 g y P3=5,0153 g

M2: P1=5,0088 g; P2=5,0785 g y P3=5,0789 g

M3: P1=5,0125 g; P2=5,0497 g y P3=5,0340 g

Por cada muestra se juntaron los pesos con los tratamientos en unos potecitos, luego se taparon los potecitos, a continuación todas las muestras previamente rotuladas se pusieron en la cámara de refrigeración a una temperatura de 4.3°C.

Al día siguiente se procedió a filtrar, para lo cual se hizo lo siguiente: Se cogieron 9 fiolas con sus respectivos embudos, paralelamente se cortaron el papel filtro en pequeños cuadrados, en seguida se doblaron cada uno de ellos, formando triángulos; después cada papel filtro doblado se puso en los embudos, a continuación se sacaron las muestras de la cámara de refrigeración y se realizó el filtrado, cada fiola se rotuló para evitar la equivocación.

Con la ayuda de las micropipetas graduadas en 750 µl, se adicionó en los pequeños envases la cantidad de 1500 µl, esto se realizó por cada muestra.

A continuación se puso a centrifugar todas las muestras que han sido en total 27 muestras pequeñas. Se realizó la centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos.

Se cogió las gradillas, y en ella se puso los tubos de ensayo que fueron en total 54 tubos de ensayo, todos ellos colocados en dos filas, apareados; luego con la ayuda de las micropipetas, el primero de ellos se graduó a 80 µl y luego

se succionó la dicha cantidad para adicionar a los tubos de ensayo que estuvieron adelante; y para la parte posterior se adicionó la cantidad de 920 µl. Posteriormente a todas las muestras de adelante se adicionó 920 µl de de pH 1,0 y a los de atrás 920 µl de pH 4,5; en seguida se realizó la agitación con la ayuda del vortex, cada tubo de ensayo y finalmente las muestras se pusieron en las cubetas de espectrofotómetro de 1,5 ml, para ser lecturados a 510 nm, registrándose la absorbancia en el cuaderno de campo.

c. Cuantificación de antocianinas totales.

La concentración de antocianinas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$C(\text{mg/g}) = (A_{\text{pH}=1.0} - A_{\text{pH}=4.5}) * 484.82 \left(\frac{1000}{24825} \right) * DF$$

Dónde:

- 484,82 es la masa molecular de la cianidina-3-glucósido
- 24825 es la absortividad molar a 510 nm
- a pH = 1,0; pH = 4,5 es la corrección de la formación de productos de degradación
- DF es el factor de dilución (se trabajó con un factor de dilución de 0,05<> 50 ml).

3.7.2.2. Cuantificación de polifenoles totales mediante el método de azul de prussian

La cuantificación de polifenoles totales por el método de azul de prusian descrito por; Margraf *et al.* (2015), cuya metodología fue la siguiente:

a. Preparación de soluciones:

Solución **A**: 0,5 mM FeCl₃.6 H₂O (270.3; 99.0%) en 0,01 N HCl

Solución **B**: 0,5 mM K₃Fe (CN)₆ (329.25; 99.0%) en H₂O destilada.

b. Preparación de los extractos acuosos. Se pesó 3 g aproximadamente de mashua rayada por cada muestra siendo: M1=3,0905 g, M2=3,0260 g y M3=3,0764 g; en seguida se adicionó a cada muestra 15 ml de agua y 15 ml de alcohol 96°, posteriormente se puso en refrigeración a una temperatura de 5,7°C.

c. Curva de calibración

1. Se preparó una solución Stock de 1 mg/mL de ácido gálico.
2. Se colocó en un tubo de ensayo 350 μ L de ácido gálico (Sol. De trabajo de 1 hasta 10 μ g/mL), se adicionó 400 μ L de solución A, luego se adicionó 400 μ L de solución B. Transcurrido 10 minutos se transfirió a las cubetas de poliestileno y se leyó la Abs. a 725 nm. El blanco se realizó empleando las mismas proporciones, pero en lugar de soluciones de trabajo se usó agua destilada (los valores de Abs. registrados en el espectrofotómetro, se calibró a cero).
3. Mediante ARLn de las Abs Vs Concentración de ácido gálico, se obtuvo la ecuación de la curva de calibración.

3.7.2.3. Cuantificación de ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cuantificación de ácido ascórbico por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), descrito por; Pertuzatti *et al.*(2015), cuya metodología fue la siguiente:

Se preparó una solución de ácido metafosfórico al 4,5%.

La fase móvil se preparó con ácido acético en agua ultrapura (concentración de 0,1 %) la cantidad de 1L, posteriormente se filtró en el quitazato con unas hojitas de 0,45 μ m de porosidad por 47 mm de diámetro; esta fase móvil se preparó para bombear el HPLC.

Preparación de muestras.

Se pesó 10 g de mashua rayada, de la siguiente manera; M1=10,0638 g, M2=10,1730 g y M3=10,1878 g, luego a cada muestra se añadió 30 ml de ácido

metafosfórico al 4,5%, luego se homogenizó y se puso en la cámara de refrigeración por un tiempo de una 1 hora protegido de la luz. Cumplido el tiempo se sacó las muestras para luego completarlo con agua ultra pura hasta enrrazar los 50 ml. Se filtró las muestras, luego se colocó en pequeños potesitos, inmediatamente se llevó a centrifugar (10000 rpm, 10 min, 4 °C). Por último se transfirió a viales de 1,5 ml.

Condiciones de separación y cuantificación

10 µl de la muestra, se inyectó en el sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se empleó un detector de arreglo de diodos (DAD), con longitud de onda a 254 nm. La fase móvil consistió en agua ultrapura con 0,1% de ácido acético, con un flujo de 0,8 mL/min (tiempo de análisis 10 min). Los datos fueron adquiridos y procesados utilizando el software ClarityChrom. Los picos se identificaron comparando el tiempo de retención de los estándares de ácido L-ascórbico. La cuantificación de la vitamina C se evaluó de acuerdo con la curva de calibración estándar externo de L-ácido ascórbico. Los resultados se expresaron en ug AA/ g de muestra.

3.7.3. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

3.7.3.1. Determinación de actividad antioxidante por el método del radical DPPH

La determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH, descrito por; Brand-Williams *et al.* (1995), cuya metodología fue la siguiente:

Procedimiento

- a. Preparación de soluciones de trabajo. Se preparó las siguientes soluciones:
 - 100 mL de 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (100 µM) se diluyó en metanol.
 - Se ajustó la absorbancia en un rango de 0,9-1,2
 - Soluciones de trabajo de ácido ascórbico a concentraciones de 2,5 – 20,0

mg/100 mL.

- Se preparó soluciones de trabajo de Trolox 0 – 20 μM

- b.** Curva estándar. Se hizo reaccionar 50 μL de solución de trabajo o muestra con 950 μL de DPPH (100 μM) por 30 minutos en oscuridad, la absorbancia se registró a 517 nm.

Mediante ARLn de las Abs Vs Concentración de ácido ascórbico, se obtuvo la ecuación de la curva de calibración.

Nota: Para la actividad antioxidante por DPPH, en forma general o secuestro del radical DPPH por extracto etanólico y agua se hizo unas tres lecturas por cada muestra, todo ello después de haber permanecido en oscuridad por 30 min.

Posteriormente en su forma más detallada o actividad antioxidante por IC_{50} DPPH frente a extracto acuoso y etanólico, se trabajó con factores de dilución como: FD 5, FD 10 y FD 15, para lo cual se pesaron la mashua negra rayada; M1=3,0445 g, M2=3,0608 g y M3=3,0970 g, posteriormente a cada muestra se adicionó 15ml de agua y 15 ml de alcohol 96°, inmediatamente se puso a refrigerar a una temperatura de 5,5 °C por 6 horas, a continuación se procedió a filtrar las muestras. En seguida con la ayuda de la micropipeta graduada en 750 μl , se procedió a adicionar en pequeños envases la cantidad de 1500 μl , por muestra 4 réplicas; en seguida se puso a centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos. A continuación para el FD 5 se preparó la muestra con 200 μl de muestra centrifugada + 800 μl de agua y alcohol; para el FD 10 con 200 μl +1800 μl de agua y alcohol; para el FD15 con 200 μl + 2800 μl de agua y alcohol (esto se hizo para las tres muestras), de cada uno de las muestras por factores de dilución se succionaron con la micropipeta 100 μl de muestra + 900 μl de DPPH, luego se homogenizó con el vortex, en seguida cada tubo de ensayo con contenido se adicionó en las cubetas de poliestileno de 1,5 ml, finalmente se leyó la absorbancia a 517 nm. Esto mismo se hizo para todos los tubos de ensayo con contenido.

3.7.3.2. Determinación de la actividad antioxidante método del ABTS

La determinación de la actividad antioxidante por el método del ABTS descrito por; Fellegrini *et al.* (1999), cuya metodología fue la siguiente:

Metodología

Preparación de soluciones de trabajo. Se prepararon las siguientes soluciones:

- Stock de ABTS⁺ (se mezcló 5 mM de ABTS en agua con 88 uL de persulfato de potasio a 140 mM; se dejó a temperatura ambiente por 12 – 16 horas antes de uso, protegido de la luz).
- Solución de trabajo de ABTS⁺, se diluyó el stock en 70 ml de etanol (se ajustó la Abs= 0,9-1,2 a 734 nm)
- Se preparó soluciones de trabajo de ácido ascórbico a concentraciones de 2,5 – 20,0 mg/100 mL.
- Soluciones de trabajo de Trolox 0 – 20 uM

a. Curva estándar. Se hizo reaccionar 50 µL de solución de trabajo o muestra con 950 µL de ABTS⁺ (diluido) por 10 minutos en oscuridad, la absorbancia se registró a 734 nm.

b. Coeficiente de inhibición (IC₅₀)

Se determinó mediante un análisis de regresión de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical ABTS⁺. Se hizo reaccionar 50 µL de muestra con 950 µL de ABTS⁺, la absorbancia se registró a 734 nm, a intervalos de 30 segundos durante 10 minutos.

El porcentaje de inhibición del radical ABTS se calculó de la siguiente manera:

$$\%INH\ ABTS = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100$$

Donde:

Abs_f es la absorbancia del radical ABTS⁺ al final de la reacción

Abs_i es la absorbancia del radical al inicio de la reacción.

El valor de IC_{50} , se obtuvo, reemplazando 50 en el eje de Y, en la ecuación que se obtuvo al final de procesar los datos ($Y = ax + b$). El mismo procedimiento se hizo con factores de dilución como: FD5, FD10 y FD 15.

3.7.4. Rendimiento de colorante en mashua negra

Según la metodología descrita por Yong y Howar (2003), con algunas modificaciones; se realizó lo siguiente, primeramente se pesó por cada muestra, la cantidad de 1kg de mashua negra, en seguida se procedió a lavar y rayar las muestras, una vez rayadas las muestras se realizó la filtración con la ayuda de un paño fino, tratando de filtrar todo lo que se puede, estos fueron filtrados en los vasos precipitados de 1L. Con los bagazos que quedaron se hizo otro tratamiento, para que se siga extrayendo colorante; los bagazos de las muestras se les pusieron en vasos precipitados o jaras medidoras para luego acidificar con agua a un pH de 4,5 con HCL a 0,5 N, la cantidad de 300 ml en cada muestra. Posteriormente el colorante obtenido por muestras (M1, M2, M3; M1_{Ac}, M2_{Ac}, M3_{Ac} en ml); todas las muestras se pusieron en refrigeración por 12 horas a 4°C. Una vez retiradas las muestras de la cámara de refrigeración se llevó a centrifugar, adicionándose en los tubos falcón de 50 ml, colocándose las muestras líquidas en la centrífuga a 10000 rpm por un tiempo de 10 minutos. Una vez realizado la centrifugación de las muestras y quedando el colorante de mashua negra sin algunas partículas, inmediatamente se realizó el baño maría con agitación a 40°C por un tiempo de 10 horas, con la finalidad que se concentre el colorante de las muestras en forma líquida, posteriormente se midió la cantidad de colorante en ml, que fueron: para M1 (579 y 582 ml), M2 (493 y 491 ml), y M3 (645 y 635 ml) de colorante concentrado, el rendimiento de colorante en mashua negra se calculó en porcentaje (%), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento de colorante} = \frac{V_{fm}}{P_{om}} \times 100$$

Donde:

V_{fm} : Volúmen final de la muestra (colorante de la mashua negra en ml).

P_{om} : Peso inicial de la muestra (1 kg de mashua negra = 1000 g).

Procedimiento

- La muestra M1 ubicada a 4039 msnm, C.P. San Joaquín- Ambo.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento de colorante M1 (1)} &= \frac{579 \text{ ml}}{1000 \text{ g}} \times 100 = 57,9 \% \\ \text{Rendimiento de colorante M1 (2)} &= \frac{582 \text{ ml}}{1000 \text{ g}} \times 100 = 58,2\% \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{Rendimiento de colorante M1 (1)} \\ \text{Rendimiento de colorante M1 (2)} \end{aligned}} \right\} \mu = 58,05 \%$$

- La muestra M2 ubicada a 3814 msnm, Ayapiteg- Chavinillo.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento de colorante M2 (1)} &= \frac{493 \text{ ml}}{1000 \text{ g}} \times 100 = 49,3\% \\ \text{Rendimiento de colorante M2 (2)} &= \frac{491 \text{ ml}}{1000 \text{ g}} \times 100 = 49,1\% \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{Rendimiento de colorante M2 (1)} \\ \text{Rendimiento de colorante M2 (2)} \end{aligned}} \right\} \mu = 49,2\%$$

- La muestra M3 ubicada a 3463 msnm, Sillapata – Dos de Mayo.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento de colorante M1 (1)} &= \frac{645 \text{ ml}}{1000 \text{ g}} \times 100 = 64,5\% \\ \text{Rendimiento de colorante M1 (2)} &= \frac{635 \text{ ml}}{1000} \times 100 = 63,5\% \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{Rendimiento de colorante M1 (1)} \\ \text{Rendimiento de colorante M1 (2)} \end{aligned}} \right\} \mu = 64,0\%$$

IV. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO

En el cuadro 14 se presentan los valores con su correspondiente desviación estándar de los resultados de la caracterización físico química en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco.

Para el caso de pH, sólidos solubles, humedad y cenizas (Anexo 1a, 1b, 1e y 1f), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05; lo que indica que se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula, en el cuadro 14 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes; entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco estuvieron influenciados por la altitud; es decir existió variación respecto a pH (6,19; 6,21 y 6,28), sólidos solubles (5,33; 2,77 y 6,03 g de sacarosa/g de líquido), humedad (87,83; 89,06 y 86,19 %) y cenizas (4,96; 4,72 y 4,20 %).

Para el caso de acidez titulable y grasa (Anexo 1c y 1d), se observa que la probabilidad o el valor de P es mayor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis nula y se rechazó la hipótesis alternativa, en el cuadro 14 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se observa claramente que no existe diferencias significativas; es decir las medias o promedios de las muestras son iguales, entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco con respecto a acidez titulable (0,32; 0,29 y 0,31 g AA/g de muestra) y grasa (0,71; 0,64 y 0,60 %) no estuvieron influenciados por la altitud donde fueron cultivados.

Cuadro 14. Caracterización físico química en mashua negra

Muestra (M)	pH	Sólidos solubles (g de sacarosa/g de líquido)		Grasa (%)	Humedad (%)	Ceniza (%)	Índice de madurez
		Acidez titulable (g de ácido ascórbico/g de muestra)					
M1	6,19±0,05 ^a	5,33±0,51 ^a	0,32±0,04 ^a	0,71±0,09 ^a	87,83±0,37 ^{ab}	4,96±0,21 ^a	0,17±0,01 ^a
M2	6,21±0,03 ^{ab}	2,77±0,25 ^b	0,29±0,05 ^a	0,64±0,03 ^a	89,06±1,50 ^b	4,72±0,12 ^a	0,10±0,03 ^b
M3	6,28±0,02 ^b	6,03±0,15 ^a	0,31±0,05 ^a	0,60±0,10 ^a	86,19±0,42 ^a	4,20±0,12 ^b	0,20±0,04 ^a

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Medias con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Donde:

M1: Ubicado a 4039 msnm, en el C.P. San Joaquín, San Rafael, Ambo –Huánuco.

M2: Ubicado a 3814 msnm, en Ayapiteg, Chavinillo, Yarowilca – Huánuco.

M3: Ubicado a 3463 msnm, en Sillapata, Dos de Mayo –Huánuco.

4.2. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO

Los compuestos bioactivos en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco se muestran en el cuadro 15.

Cuadro 15. Compuestos bioactivos en mashua negra.

Muestra (M)	Antocianinas(mg cianidina-3-glucosido/ g de muestra)	Polifenoles totales (μ g AGE/g de muestra)	Ácido ascórbico (μ g AA/g de muestra)
M1	0,061 \pm 0,0014 ^b	308,06 \pm 22,21 ^b	188,93 \pm 9,93 ^c
M2	0,0590 \pm 0,0013 ^b	276,87 \pm 7,14 ^b	275,57 \pm 6,72 ^b
M3	0,1130 \pm 0,0069 ^a	365,54 \pm 14,05 ^a	327,13 \pm 1,85 ^a

Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm la desviación estándar.

Medias con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para el caso de antocianinas, (Anexo 2a), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula; en el cuadro 15 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes; entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco estuvieron influenciados por la altitud en cuanto a antocianinas se refiere, siendo el mejor la muestra M3 (3463 msnm) con un valor de 0,1130 mg de cianidina-3-glucósido/g de muestra, como se muestra en la figura 6.

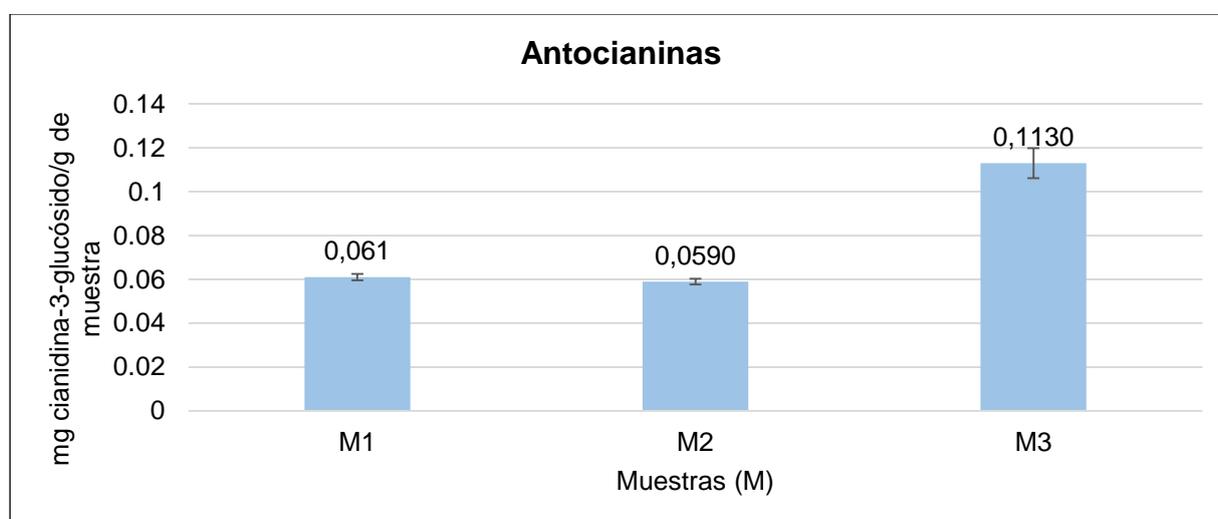


Figura 6. Contenido de antocianinas en mashua negra.

Para el caso de polifenoles totales, (Anexo 2b), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula, en el cuadro 15 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes; entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco estuvieron influenciados por la altitud referente a polifenoles totales, siendo el mejor la muestra M3 (3463 msnm) con un valor de 365,54 $\mu\text{g AGE/g}$ de muestra, como se observa en la figura 7.

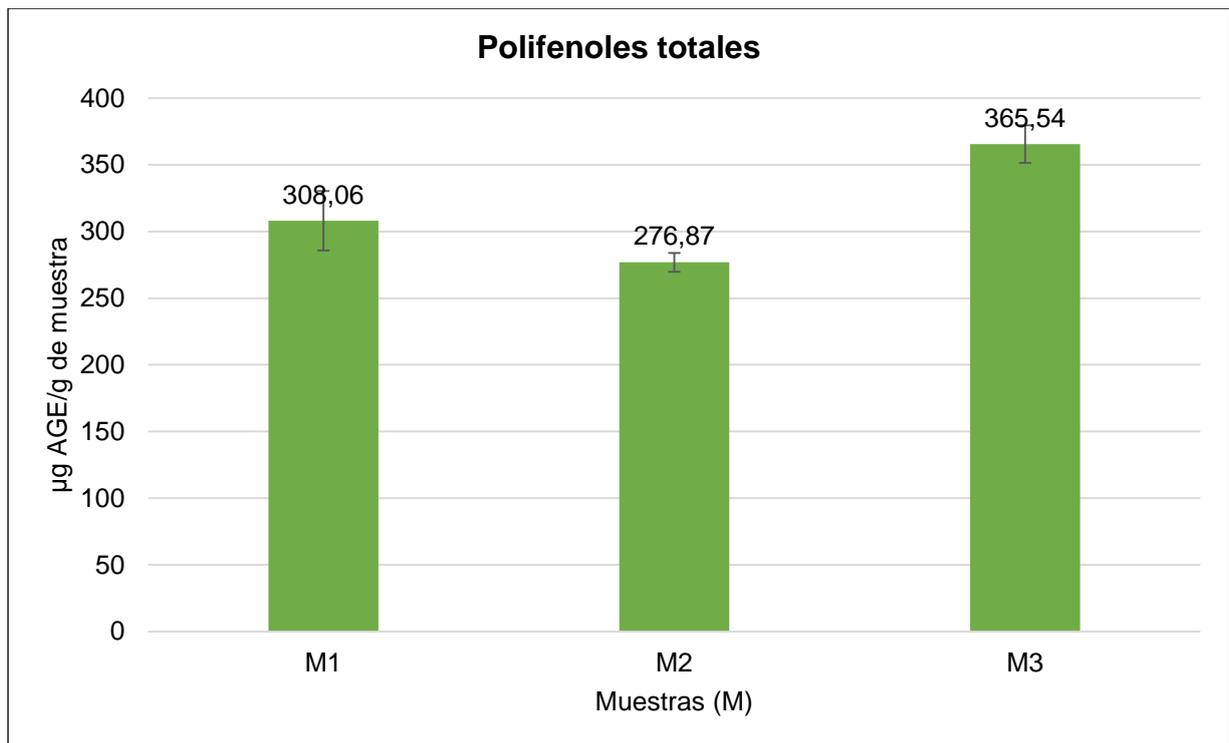


Figura 7. Contenido de polifenoles totales en mashua negra.

Para el caso de ácido ascórbico, (Anexo 2c), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula, en el cuadro 15 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes; entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco estuvieron influenciados por la altitud en cuanto a ácido ascórbico, siendo el mejor la muestra M3 (3463 msnm) con un valor de 327,13 $\mu\text{g AA/g}$ de muestra, como se muestra en la figura 8.

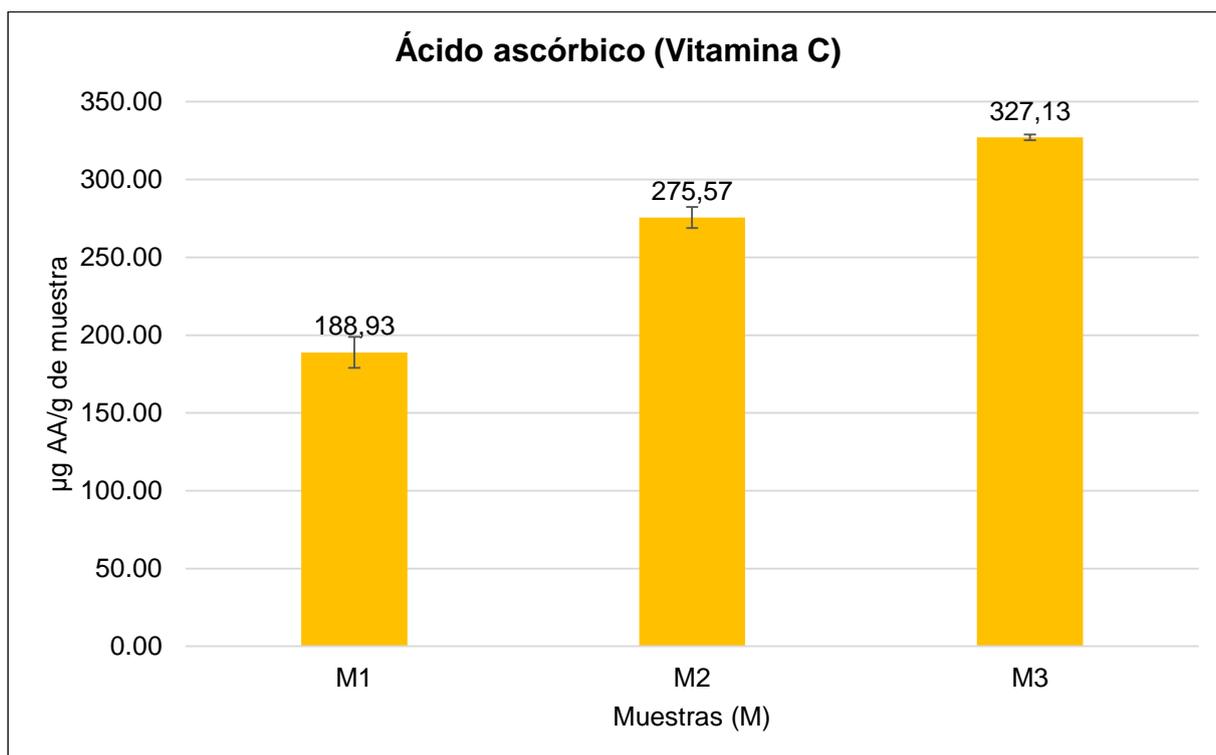


Figura 8. Contenido de ácido ascórbico en mashua negra.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO

La actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco fue determinado en dos formas; el primero fue el porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y extracto acuoso en mashua negra, segundo la actividad antioxidante en términos de IC_{50} DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico en mashua negra.

4.3.1. Porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y agua en mashua negra.

El porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y agua en mashua negra fueron expresados en mg TE/ g de muestra, los resultados se muestran en el cuadro 16, las medias con sus respectivas desviaciones estándar.

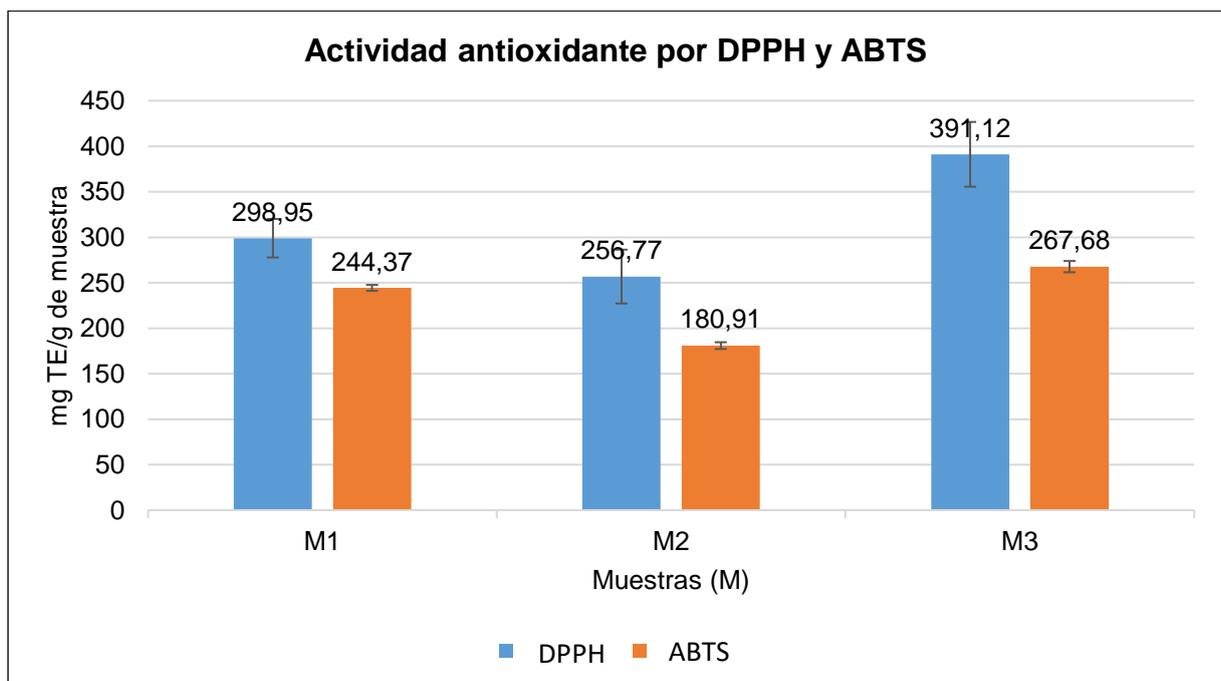
Cuadro 16. Actividad antioxidante por DPPH y ABTS en trolox equivalente.

Muestra (M)	Actividad antioxidante por DPPH (mg TE/g de muestra)	Actividad antioxidante por ABTS (mg TE/g de muestra)
M1	298,95±21,19 ^b	244,37±3,26 ^b
M2	256,77±29,58 ^b	180,91±3,71 ^c
M3	391,12±35,62 ^a	267,68±6,19 ^a

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Medias con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para los casos de actividad antioxidante por DPPH y ABTS (Anexo 3a y 3b), se observa que la probabilidad o el valor de P fueron menores a 0,05, lo que indica que se aceptaron las hipótesis alternativas y se rechazaron las hipótesis nulas; en el cuadro 16 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes; entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco estuvieron influenciados por la altitud referentes a la actividad antioxidante por DPPH y ABTS; en cuanto a la actividad antioxidante por DPPH fue el mejor la muestra M3 (3463 msnm) con un valor de 391,12 mg TE/ g de muestra, y por otra parte en cuanto a actividad antioxidante por ABTS fue el mejor la muestra M3 (3463 msnm) con un valor o cantidad de 267,68 mg TE/g de muestra, como se muestra en la figura 9.

**Figura 9.** Actividad antioxidante por DPPH y ABTS en trolox equivalente.

4.3.2. Actividad antioxidante IC₅₀ por el método de DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico en mashua negra

La actividad antioxidante IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuosos y etanólico en mashua negra se muestra en el cuadro 17, las medias con sus respectivos desviación estándar.

Cuadro 17. Actividad antioxidante IC₅₀ DPPH y ABTS

Muestra (M)	IC ₅₀ DPPH(g/ml de muestra)	IC ₅₀ ABTS (g/ml de muestra)
M1	0,0019±0,0002 ^a	0,0011±0,0001 ^b
M2	0,0020±0,0001 ^a	0,0009±0,00004 ^a
M3	0,0020±0,0003 ^a	0,0008±0,00005 ^a

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (p<0.05).

Para el caso de actividad antioxidante en términos de IC₅₀ DPPH (Anexo 3c), se observa que la probabilidad o el valor de P es mayor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis nula y se rechazó la hipótesis alternativa, en el cuadro 17 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde no existe diferencias significativas entre los contrastes; es decir las medias de las muestras fueron iguales, entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco no estuvo influenciado por la altitud en cuanto a IC₅₀ DPPH.

Para el caso de actividad antioxidante en términos de IC₅₀ ABTS (Anexo 3d), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula, en el cuadro 17 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes, entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco estuvieron influenciados por la altitud en cuanto a IC₅₀ ABTS, siendo el mejor la muestra M3 (3463 msnm) con un valor de 0,0008 g/ml de muestra.

En la figura 10, se muestran la actividad antioxidante en términos de IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuosos y etanólico en mashua negra.

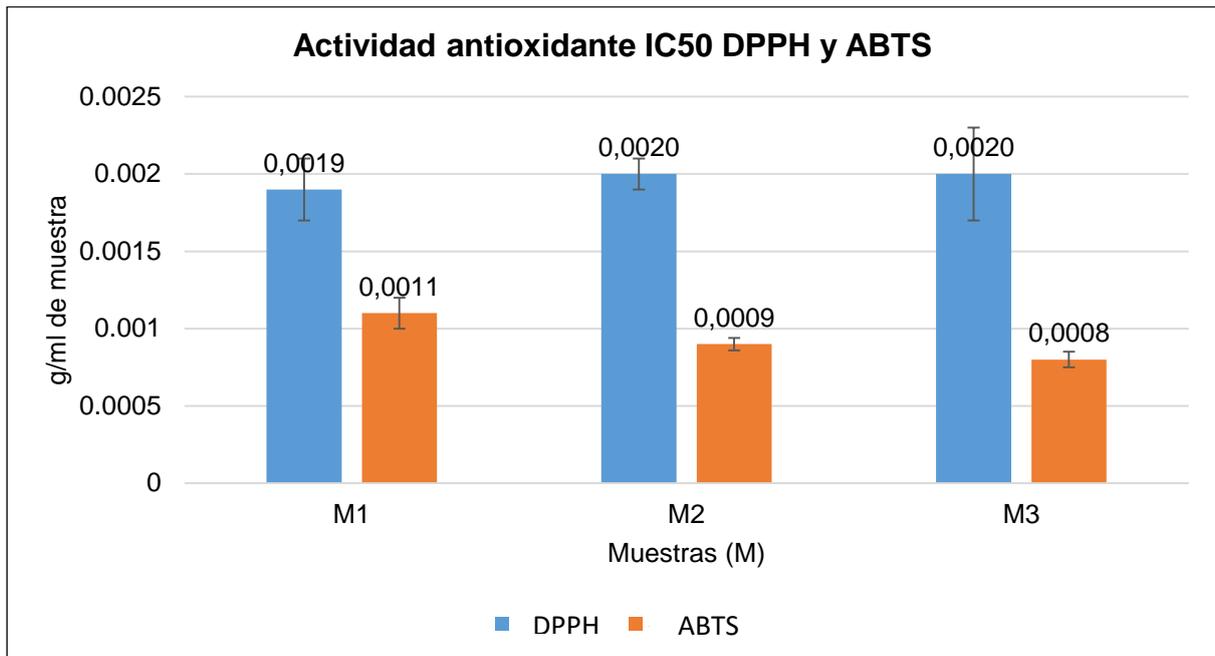


Figura 10. Actividad antioxidante IC₅₀ DPPH y ABTS.

4.4. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE COLORANTE EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.

Con respecto al rendimiento de colorante en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco; los resultados se muestran en el cuadro 18, las medias y desviaciones estándar.

Cuadro 18. Rendimiento de colorante en mashua negra.

Muestra (M)	Recuento	Contenido % (v/p)
M3	2	64,00±0,71 ^a
M1	2	58,05±0,21 ^b
M2	2	49,20±0,14 ^c

Cada valor representa la media de dos repeticiones ± la desviación estándar.

Medias con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para el caso de rendimiento de colorante en mashua negra (Anexo 4a), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula, en el cuadro 18 se muestra la clasificación Tukey HSD, donde se evidencia unas diferencias significativas entre los contrastes; entonces la mashua negra cultivada en tres altitudes de la región

Huánuco estuvieron influenciados por la altitud. La muestra M3 (3463 msnm) fue la mejor con un porcentaje de 64,00% de rendimiento de colorante, como se muestra en la figura 11.

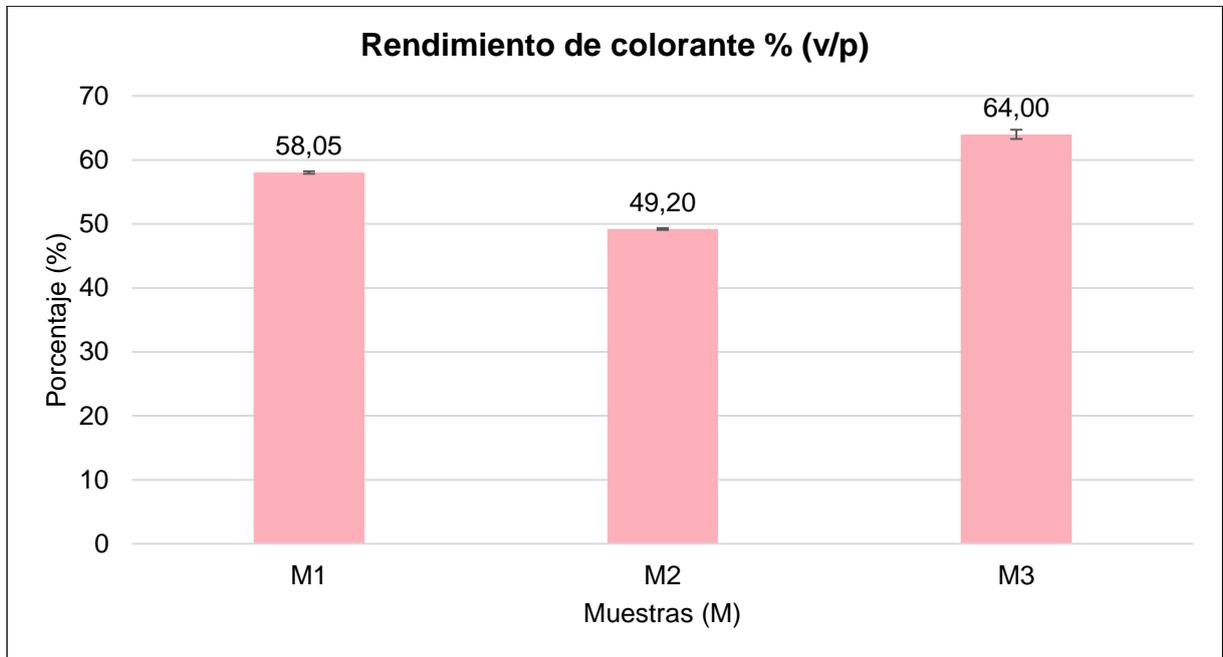


Figura 11. Rendimiento de colorante en mashua negra (%).

V. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO

En el cuadro 14, referente a la caracterización físico química en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco; para el caso de pH, sólidos solubles, humedad y cenizas; se observó que existen diferencias significativas; es decir variaron de acuerdo a la altitud donde fue cultivada la mashua negra. Según Taipei (2017), la media o el promedio del pH fue $6,29 \pm 0,01$; este valor comparado, con los resultados que fueron $6,19 \pm 0,05$ (4039 msnm), $6,21 \pm 0,03$ (3814 msnm) y $6,28 \pm 0,02$ (3463 msnm), estos resultados se encuentran por debajo de lo mencionado por Taipei (2017). En el cuadro 14, se observa que a medida que se incrementa la altitud, bajó la cantidad de pH de 6,28 a 6,19.

Asimismo en el cuadro 14, se observa a los sólidos solubles. Según Taipei (2017), el contenido promedio de los sólidos solubles fue $6,12 \pm 0,23$; este valor comparado con los resultados que fueron $5,33 \pm 0,51$ (4039 msnm), $2,77 \pm 0,25$ (3814 msnm) y $6,03 \pm 0,15$ (3463 msnm), los resultados se encuentran por debajo de lo mencionado por Taipei (2017); sin embargo la muestra M3 (3463 msnm) se encontró muy cercano a diferencia de los otros dos. Para el caso de humedad (%), según Taipei (2017), la humedad promedio fue $85,73 \pm 0,07$, y por otra parte según Tapia (2012), el porcentaje de humedad se encontró en un rango de 79,10-88,80; estos valores comparados con los resultados obtenidos que fueron $87,83 \pm 0,37$ (4039 msnm), $89,06 \pm 1,50$ (3814 msnm) y $86,19 \pm 0,42$ (3463 msnm); con relación a lo mencionado por Taipei (2017), los resultados que fueron obtenidos se encuentran por encima o fueron superiores a ello; además por otra parte lo mencionado por Tapia (2012), los resultados que fueron obtenidos, dos de las muestras se encuentran dentro del rango y una de ellas fuera de rango.

Para el caso de las cenizas (%), según Taipei (2017), el contenido promedio de cenizas fue $0,607 \pm 0,008$; los resultados obtenidos fueron $4,96 \pm 0,21$ (4039 msnm), $4,72 \pm 0,12$ (3814 msnm) y $4,20 \pm 0,12$ (3463 msnm), estos mismos fueron equivalentes

a 4,96 % (0,6441g), 4,72 % (0,5830g) y 4,20% (0,7753g), todos ellos fueron incinerados en base a 5 g de muestra; comparando los resultados que fueron obtenidos con lo mencionado por Taipe (2017), se observa que existen diferencias entre ambas partes.

Para el caso de acidez titulable y grasa (%), en el cuadro 14 se observa que no existe diferencias significativas; en cuanto a acidez titulable, según Taipe (2017), el contenido promedio de acidez titulable fue $1,53 \pm 0,045$, este valor comparado con los resultados obtenidos que fueron $0,32 \pm 0,04$ (4039 msnm), $0,29 \pm 0,05$ (3814 msnm) y $0,31 \pm 0,05$ (3463 msnm), se encuentra por encima de los resultados que fueron obtenidos. En cuanto al porcentaje de grasa, según Taipe (2017), el contenido promedio de grasa en mashua negra fue 0,452 g/100g de muestra, este valor comparado con los resultados obtenidos que fueron $0,71 \pm 0,09$ (4039 msnm), $0,64 \pm 0,03$ (3814 msnm) y $0,60 \pm 0,10$ (3463 msnm), estos mismos que fueron equivalentes a 0,71%(0.0355 g), 0,64 % (0.0319 g) y 0,60 % (0.0298 g), fueron superiores a los resultados que fueron obtenidos, esto se debe a que se utilizaron diferentes cantidades de muestra y obviamente diferente metodología.

5.2. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO.

Para el caso de antocianinas; según Inostroza *et al.* (2015), el contenido promedio de antocianinas en mashua fue $192,63 \pm 1,28$ (mg equivalente/100 g), entonces 192,63 mg de cianidina-3-glucósido/100 g (1,9263 mg de cianidina-3-glucósido/g de muestra), este valor comparado con los resultados obtenidos que fueron $0,061 \pm 0,0014$ (4039 msnm), $0,0590 \pm 0,0013$ (3814 msnm) y $0,1130 \pm 0,0069$ (3463 msnm); se encuentra por encima o fue superior a los resultados obtenidos. En cuanto a los resultados que fueron obtenidos como se muestra en el cuadro 15, existe diferencias significativas; esto se debe a lo manifestado por Wrolstad (2000), las antocianinas son sustancias relativamente inestables en estado puro, sin embargo, son resistentes en la naturaleza a las condiciones de luz, pH y la oxidación debido a su interacción con otras moléculas como son los aminoácidos, ácidos orgánicos, taninos. Los principales factores que afecta la degradación de estos pigmentos son el

pH, la temperatura y la concentración de oxígeno. Factores que ordinariamente tienen menos importancia son la presencia de enzimas degradativas, ácido ascórbico, dióxido de azufre, iones metálicos y azúcares. La copigmentación puede afectar la velocidad de degradación. Según Márquez (2011), las antocianinas por su diversidad estructural no son resistente a los efectos de deterioro de varios agentes, las antocianinas diglicosiladas son más estables a la decoloración durante el almacenamiento; las antocianinas que contienen dos o más grupos muestran una excelente estabilidad a través de un completo rango de pH, el pH tiene un efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. Según Timberlake (1980), la temperatura, el oxígeno, las enzimas influyen en la degradación y decoloración de las antocianinas, la copigmentación es un fenómeno por el cual el color de las antocianinas se vuelve más azul, brillante y estable debido a la interacción entre diferentes sustancias orgánicas. Según Markakis (1982), la luz tiene dos efectos sobre las antocianinas; favorece su biosíntesis pero acelera también su degradación. Estos compuestos son generalmente inestables al ser expuestos a la luz ultravioleta y visible ante cualquier fuente de radiación ionizante.

Según Huaccho (2016), el contenido de antocianinas que fue evaluado en 84 cultivares de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón) estuvieron comprendidos entre 0,09 y 2,68 mg de cianidina-3-glucósido equivalentes (b.s); realizando la comparación con los resultados obtenidos, estos fueron inferiores a 2,68; las muestras estuvieron más cercanos al 0,09.

Para el caso de polifenoles totales, según Inostroza *et al.* (2015), el contenido promedio de polifenoles fue $314,12 \pm 1,23$ mg equivalente/ 100 g de muestra, realizando la conversión $314,12$ mg AGE/100 g ($3141,2$ μ g AGE/g de muestra), este valor comparado con los resultados obtenidos que fueron: $308,06 \pm 22,21$ (4039 msnm), $276,87 \pm 7,14$ (3814 msnm) y $365,54 \pm 14,05$ (3463 msnm); existe una diferencia muy amplia. Según Chirinos *et al.* (2007), menciona que el contenido de polifenoles totales fue $37,67$ mg AG/100 g ($376,7$ μ g AGE/g de muestra), comparando este valor con los resultados obtenidos, se encuentra muy cercano, aproximado; más cercano el M3 (3463 msnm) con un valor de $365,54$ μ g AGE/g de muestra, a diferencia de los otros dos. Por otra parte según Taipe (2017), señala que el contenido promedio de polifenoles fue $15,16 \pm 0,57$ mg AGE/g de muestra (15160 μ g AGE/g de muestra), este

valor comparando con los resultados que fueron obtenidos, existe mucha diferencia; es decir fue superior a los resultados obtenidos, en tal sentido entonces la que se aproxima más a los resultados obtenidos es el mencionado por Chirinos *et al.* (2007).

El contenido de los compuestos fenólicos según Huaccho (2016), evaluados en 84 cultivares de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) el rango fue de 5,5 a 16,7 mg AGE/ g de muestra (5500 a 16700 μg AGE/ g de muestra), los resultados que fueron obtenidos son inferiores, esto se debió probablemente por la cantidad de muestra y la metodología.

Según Arias y Juli (2011), el contenido de polifenoles totales que fueron determinados en dos clones de papa nativa del genero *solanum* de pulpa azul y rojo fue de 1,84 y 1,08 mg AGE/ g MF (1840 y 1080 μg AGE/g de muestra); comparando con los resultados del cuadro 15, el contenido de polifenoles totales en mashua negra es menor al de la papa.

Con respecto al ácido ascórbico (vitamina C), según Rojas (2008), el contenido promedio de ácido ascórbico fue 77,37 mg AA/100 g de materia fresca (773,7 μg AA/g de muestra), este valor comparado con los resultados que fueron $188,93 \pm 9,93$ (4039 msnm), $275,57 \pm 6,72$ (3814 msnm) y $327,13 \pm 1,85$ (3463 msnm), se encuentra por encima o fue superior a los resultados obtenidos. En el cuadro 15, en cuanto a los resultados que fueron obtenidos, se observa unas diferencias significativas entre las tres muestras; a mayor altitud, menor fue el contenido de ácido ascórbico; y a menor altitud mayor es el contenido de ácido ascórbico.

Según Arias y Juli (2011), el contenido de ácido ascórbico que fueron determinados en dos clones de papa nativa del genero *solanum* de pulpa azul y rojo fue de 7,94 y 7,37 μg AA/ g MF; comparando con los resultados del cuadro 15, el contenido de ácido ascórbico en mashua negra es mayor al de la papa.

5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUÁNUCO

La actividad antioxidante por DPPH y ABTS en mashua negra cultivada en tres altitudes de la región Huánuco, se discutió en las dos formas; el primero, porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y agua, y el segundo, actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico.

5.3.1. Porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto etanólico y agua en mashua negra.

Para el caso de actividad antioxidante por DPPH, según Inostroza *et al.* (2015), la actividad antioxidante en mashua por DPPH fue $14,2 \pm 0,2$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra, por 30 min y $15,8 \pm 0,3$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra, por 60 min; entonces realizando las conversiones fueron $14,2$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra ($3,55$ mg TE/ g muestra, por 30 min) y $15,8$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra ($3,95$ mg TE/ g de muestra, por 60 min), estos valores comparados con los resultados obtenidos que fueron $298,95 \pm 21,19$ (4039 msnm), $256,77 \pm 29,58$ (3814 msnm) y $391,12 \pm 35,62$ (3463 msnm), por 30 min; son valores muy inferiores a los resultados que fueron obtenidos.

Según Taipei (2017), la capacidad antioxidante en mashua negra en estado fresco fue $94,80 \pm 0,53$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra ($23,73$ mg TE/g de muestra), fue determinado por el método DPPH, este valor comparado con los resultados que fueron obtenidos fue inferior como se muestran en el cuadro 16 y en figura 9, expresados en la misma unidad; esto se debió probablemente por la cantidad de muestra que fueron utilizados en ambas partes, la metodología o el procedimiento y el tiempo, además según Taipei (2017) su muestra fue recolectada a 3732 msnm perteneciente al distrito de Cullhuas- Junin-Huancayo.

Para el caso de actividad antioxidante por ABTS, según Inostroza *et al.* (2015), la actividad antioxidante en mashua por ABTS fue $16,3 \pm 0,2$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra, por 1 min y $17,0 \pm 0,2$ $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra, por 7 min; realizando las conversiones

fueron 16,3 $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra (4,08 mg TE/g de muestra, por 1 min) y 17,0 $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra (4,26 mg TE/g de muestra, por 7 min), comparando estos valores con los resultados obtenidos que fueron $244,37 \pm 3,26$ (4039 msnm), $180,91 \pm 3,71$ (3814 msnm) y $267,68 \pm 6,19$ (3463 msnm), por 10 min; se encuentran por debajo de los resultados que fueron obtenidos por muestras.

El contenido de la capacidad antioxidante según Huaccho (2016), evaluados en 84 cultivares de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón) fue medido por tres métodos ABTS, FRAP y ORAC; los valores correspondientes fueron 20,6-128,2; 22,7-173,2 y 35,1-158,8 $\mu\text{mol TE/g b.s}$ (5,16-32,09; 5,68-43,35 y 8,78-39,74 mg TE/g de muestra) los resultados que fueron obtenidos que se muestra en el cuadro 16, son superiores a los valores de los tres métodos que fueron determinados por Huaccho (2016).

Según Chirinos *et al.* (2007), la capacidad antioxidante por el método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), en mashua morada y amarilla fue de 445,6 y 127,0 $\mu\text{mol TE/g b.s}$ (111,53 y 31,79 mg TE/g de muestra), comparado con los resultados del cuadro 16, la mashua negra presentó mayor contenido de actividad antioxidante a los de morado y amarillo.

Según Cerrón (2012), la capacidad antioxidante en papa nativa cuchipelo, por el método DPPH expresados en $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra fue 270, 95 (67,82 mg TE/g de muestra), comparando con los resultados del cuadro 16, este valor es inferior, por ello la capacidad antioxidante por DPPH de la mashua negra fue superior al de la papa y es la mejor.

5.3.2. Actividad antioxidante IC₅₀ por el método de DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico en mashua negra.

Para el caso de actividad antioxidante IC₅₀ por el método DPPH, expresados en g/ml de muestra; los resultados obtenidos fueron $0,0019 \pm 0,0002$ (4039 msnm), $0,0020 \pm 0,0001$ (3814 msnm) y $0,0020 \pm 0,0003$ (3463 msnm); según Arias y Juli (2011), la actividad antioxidante a una concentración inhibitoria 50% (IC₅₀ %) en dos clones de

papa nativa del género *solanum* de pulpa azul y rojo fue 27,52 y 76,15 µg/ml (0,000028 y 0,000076 g/ml de muestra), estos valores comparados con los resultados que fueron obtenidos, la papa nativa de pulpa azul y rojo es mejor a diferencia de la mashua negra en cuanto a IC₅₀ DPPH.

En cuadro 17, la actividad antioxidante IC₅₀ DPPH y ABTS, comparando ambos métodos, el mejor método fue por ABTS, la mejor fue la M3 (3463 msnm), con un valor de 0,0008 g/ml de muestra, pero este valor comparado con lo mencionado por Arias y Juli (2011), la mayor concentración inhibitoria IC₅₀ fue de la papa nativa en comparación con la de mashua negra.

Según Aparcana (2014), la capacidad antioxidante en los extractos etanólicos del fruto de aguay manto, obtenido como concentración inhibitoria en cuanto a IC₅₀ DPPH y IC₅₀ ABTS fue 1,86 y 1,29 mg/ml (0,0019 y 0,0013 g/ml), estos valores comparados con los resultados que se muestran en el cuadro 17, el valor 0,0019 g/ml de IC₅₀ DPPH aguay manto fue igual a la actividad antioxidante IC₅₀ DPPH en mashua negra en la muestra M1(4039 msnm), la actividad antioxidante IC₅₀ ABTS en mashua negra es mejor a la de aguay manto con un valor de 0,0008 g/ml de muestra.

5.4. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE COLORANTE EN MASHUA NEGRA CULTIVADA EN TRES ALTITUDES DE LA REGIÓN HUANUCO

En cuanto a rendimiento de colorante en mashua negra expresados en % (v/p) fueron 58,05±0,21 (4039 msnm), 49,20±0,14 (3814 msnm) y 64,00±0,71 (3463 msnm), como se observa en el cuadro 18, para cada muestra se realizó 2 réplicas; existen diferencias significativas, entre M1 (4039 msnm) y M2 (3814 msnm), hay una diferencia de 8,85; M2 (3814 msnm) y M3 (3463 msnm), hay una diferencia de -14,8 y entre M1(4039 msnm) y M3 (3463 msnm), fue una diferencia de -5,95; esto se debió probablemente al contenido de pigmentos antocianicos, que tuvo cada muestra, el que presentó mayor cantidad de colorante fue la muestra M3 (3463 msnm), con un porcentaje de 64,00%, está influenciado por la altitud donde fue cultivada la mashua negra.

Según Marina (2014), “en la obtención de extractos de antocianinas, a partir de arándanos para ser utilizados como antioxidante y colorante en la industria alimentaria”; el rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT), fue determinado por dos métodos, extracción sólido- líquido (ESLA) de colorante y extracción de antocianinas o colorante por el método de fermentación (EAF), para el caso de la primera serie (ESLA) fue a pH $3,5\pm 0,1$, T° de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, tiempo de 2h y 12 min; con todo ello el porcentaje (%) de rendimiento de extracción de colorante en arándanos fue 57%. En la segunda serie (EAF) con respecto al método de fermentación fue a pH 4,2, T° de 28°C , tiempo de 72 h; con todo ello el porcentaje (%) de rendimiento de extracción de colorante en arándanos fue 49%; comparando el rendimiento de colorante en mashua negra que se muestra en el cuadro 18 con el RAT de arándanos, la muestra M3 (3463 msnm) con un porcentaje de rendimiento de 64,00% de colorante en mashua negra fue mayor al rendimiento de colorante en arándanos (57 y 49%); entonces la mashua negra presenta mayor contenido de colorante a diferencia de arándanos y fue la mejor opción.

Según Nayhua (2017), “en la obtención de colorante natural a partir de la cáscara de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) por el método de extracción sólido – líquido para su aplicación en la industria alimentaria, fruto proveniente del distrito de San Cristobal-Moquegua” la obtención de colorante natural fue realizado por el método de extracción sólido- líquido; se obtuvo un rendimiento de colorante de 83%, asimismo este pigmento fue utilizado como colorante natural en yogurt y helados. En el cuadro 18, se observa que el rendimiento de colorante en mashua negra fue menor 83%, es decir comparando ambos rendimientos de colorantes, la cáscara de tuna púrpura presenta mayor contenido de colorante natural a diferencia de la mashua negra que solo llega a un 64, 00%.

Según López y Trujillo (2010), “en la obtención de colorantes naturales a partir de cascara *Allium cepa* (cebolla blanca y morada) y raíz de *beta vulgaris* (remolacha) para su aplicación en la industria textil” el porcentaje de rendimiento en la extracción de colorantes en cebolla blanca, cebolla morada y remolacha fue de 90%, 100% y 95% respectivamente; comparando estos porcentajes de rendimiento de colorante con los de mashua negra, estos son mayores, es decir se encuentra por encima de 64%.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y a los resultados de la investigación llego a las siguientes conclusiones:

- La caracterización físico química en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivado en tres altitudes de la región Huánuco; para el caso de pH, sólidos solubles, humedad y cenizas, varían de acuerdo a la altitud donde fue cultivada la mashua negra; en cuanto a acidez titulable y grasa no están influenciados por la altitud.
- Los compuestos bioactivos en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivado en tres altitudes de la región Huánuco; fueron mejores a 3463 msnm, en cuanto a antocianinas, polifenoles totales y ácido ascórbico o vitamina C, pertenecientes al Distrito de Sillapata-Dos de Mayo (piso ecológico páramo) todos ellos se encuentran influenciados por la altitud donde fue cultivada la mashua negra.
- La actividad antioxidante por DPPH y ABTS fueron mejores a 3463 msnm (Distrito de Sillapata-Dos de Mayo), varió de acuerdo a la altitud donde fue cultivada la mashua negra, y por otra parte en cuanto a actividad antioxidante IC_{50} DPPH y ABTS frente a extractos acuoso y etanólico; el IC_{50} DPPH no estuvo influenciado por la altitud, en cambio el IC_{50} ABTS sí estuvo influenciado por la altitud, fue el mejor a 3463 msnm (Distrito de Sillapata -Dos de Mayo).
- El rendimiento de colorante en mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*) cultivado en tres altitudes de la región Huánuco, varió de acuerdo a la altitud donde fue cultivada, el mejor fue la muestra M3, que se encuentra ubicado a 3463 msnm, Sillapata, Dos de Mayo – Huánuco.

VII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados, discusiones y conclusiones de la investigación, planteo las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda a los alumnos de pregrado o egresados, de la E.P. Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agrarias; realizar la caracterización físico-morfológica de la mashua negra, ya que esto les ayudará a tener un mejor panorama referente a ancho, peso y altura, y es más la determinación de los macronutrientes y micronutrientes en mashua negra.
- Se recomienda a la Facultad de Ciencias Agrarias, en especial a la carrera de Ingeniería Agroindustrial, realizar el análisis de suelos para los cultivos de mashua negra, a diferentes altitudes; ya que puede ser uno de los factores por las que varían en su caracterización físico química y entre otros.
- Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, que están presentes en frutas, vegetales y tubérculos, caracterizándose por sus diferentes colores, por ello se recomienda a los alumnos de pregrado o egresados aprovechar el colorante natural que presenta la mashua negra, quizá como una alternativa para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.
- Se recomienda al ministerio de agricultura, y otras entidades de la región Huánuco, poner énfasis en la agricultura, sobre todo en el cultivo de mashua negra, enviar profesionales capacitados para brindar charlas y asesoramiento técnico, de una u otra formas algunos agricultores desconocen sobre dicho producto, sabiendo que la mashua negra es beneficiosa para la salud y es más por sus propiedades medicinales; por ello se debe tomar más importancia en cuanto a antocianinas, poli fenoles, actividad antioxidante, vitaminas en fin una serie de propiedades que la caracterizan.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Alvarado, E.1991. Técnica modificada y uso de *Streptococcus Lactis* en la elaboración de yogurt. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de medicina y zootecnia. Guatemala.
2. Aoac, 1997. "Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC". 12ª. Ed. 45-47 pp.
3. Aoac, 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15 ed. EEUU. Association of Official Analytical Chemists.
4. Aoac, 2005. "Official methods of Analysis of AOAC International of Fruit Products Ed. 18ªAOAC, Cap. 37.10 p.
5. Aparcana, I.M.2014. evaluacion de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de *Physalis Peruvian* "aguaymanto" diferentes lugares geográficos del Perú. Tesis Lima-Perú.
6. Arias, E. y Juli, D.M. 2011. Antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género *solanum* de pulpa azul y rojo, tesis Sicuani- Cusco-Perú.
7. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT – Food Science And Technology, 28(1): 25-30.
8. Brennan, J. 2008. "Manual del procesado de los alimentos", Editorial Acribia SA. Zaragoza España.
9. Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R.; Arbizu, C.; Roca., W y 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. Recuperado de: http://aggie-horticulture.tamu.edu/faculty/cisneros/Papers/Campos_2006.pdf
10. Cárcel, J; Clemente, G. 2014. "Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizados como antioxidante y colorante en la industria alimentaria". Entre Rios –Argentina.

11. Castillo, S; Ramírez, I. 2006. Ensayo preliminar para la obtención de colorantes naturales a partir de especies vegetales comestibles. San Salvador, El Salvador; Centro América. Pág. 63-64.
12. Cerrón, M. 2012. Evaluación del efecto del tipo de cocción en el contenido de antocianinas y capacidad antioxidante en papa nativa cuchipelo, (Tesis Para Optar El Título De Ingeniero En Industrias Alimentarias), Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo.
13. Collazos, C.; Philip, W.; Viñas, E.; Alvistur, J.; Urquieta, A.; Vazques, J; Urquieta, A; Vasquez, J; Dias, C; Quiroz, A; Roca, A; Mark, H; Brandfield, R; Herrera, N; Faching, A; Robles, N; Hernandez, E y Arias, M. 1993. Composición de alimentos de mayor consumo en el Perú. 6ta. Edición; Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Nutrición. Lima. Perú.
14. Criado, C. y Moya, M. 2009. Vitaminas y antioxidantes. SANED Comisión de Formación Continua.
15. Cubero, N; Monteferrer, A. Y Villalta, J. 2002. "Aditivos alimentarios" colección tecnológica de alimentos, Ediciones Mundi- Prensa, Madrid España.
16. Cuya, R 2009 "Efecto de secado en bandeja y atomización sobre la actividad antioxidante de la mashua (*Tropaeolum Tuberosum* R & P) Lima – Peru.
17. Chirinos, R., Campos, D., Arbizu, C., Rogez, H., Rees, J., Larondelle., Noratto, G. y Cisneros, 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 and Agriculture. Recuperado en: <http://www.readcube.com/articles/10.1002/jsfa.2719>.
18. Díaz, F. 2009. Optimización de extracción y análisis de la capacidad antioxidante de la piel de kiwi. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, España. Recuperado de: <http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/7857/1/pfc/20Versi/C3%B3n/20final/202-7-09.pdf>.
19. Espinoza, S.; Monteghirfo, M.; Alvarez, J y Arnao, I. 2002. *Análisis electroforético unidimensional y bidimensional de las proteínas de Tropaeolum tuberosum (Mashua)*. Centro de investigación de Bioquímica y nutrición, laboratorio de química bioorgánica. Universidad Nacional Mayor De San Marco. Lima, Perú.

20. Fellegrini, N., Ke, R., Yang, M., y Rice-Evans, C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 379-389). Academic Press.
21. Fennema, O. 2000. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia S.A.
22. Fernández, P. 2011. Barrido sistemático de la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales) de alimentos vegetales del departamento de la paz. Universidad Nacional de San Andrés, La Paz, Bolivia. Recuperado de <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/1389/1/T1.pdf>
23. Frankel, E., Waterhouse, A. y Teissedre, P. 1996. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 890-894.
24. Flores, J. 2000. *Farmacología humana*. 3era edición. Masson, Barcelona-España, p. 26-29.
25. Gamarra, N., Girón, C., Roque, B., y Díaz, J. 2011. Assessment Anthocyanin content of three accessions of oca (*Oxalis Tuberosa*) in cool and cooked the departament of Junin. Universidad Nacional de Perú - Facultad Ingeniería en Industrias Alimentarias. Huancayo Perú. Recuperadode:http://issuu.com/riofa/docs/revista_de_investigacion_de_la_uncp.
26. Giannoni, D. 2018. Mashua (*Tropaeolum tuberosum*). Revisado el 14 de marzo de 2018, en http://www.peruecologico.com.pe/tub_mashua.htm
27. Gil, A. 2010. *Tratado de nutrición / Nutrition treatise: Composición y calidad nutritiva de los alimentos / Composition and nutritional quality of foods*. (Segunda edición) Madrid: Médica Panamericana.
28. Giusti. MM; Wrolstad, RE. 2001. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York.

29. Gorriti, A; Quispe, F; Arroyo, J; Córdova, A; Jurado, B; Santiago, A. 2009. Extracción de las antocianinas de las corontas de *Zea mays L.* “Maíz morado” Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM. Lima-Peru.
30. Grau, A.; Ortega, R.; Nieto, C.; y Hermann, M. 2003. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.) - International Plant Genetic Resources Institute, Italia, Roma, International Potato Center, Lima, Perú, p. 38.
31. Grupo Latino, 2009, “Volvamos al campo, manual del ingeniero de alimentos” Editorial Grupo Latina, p.159 Colombia.
32. Hernández, V. 2016. “Extracción de antocianinas a partir de maíz morado (*Zea mays L*) para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria” Lambayeque – Perú.
33. Hernández, B y León, J. 1992. Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
34. Huacho, C.V. 2016. Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón). Tesis para optar el grado de magister en tecnología de alimentos, Lima-Perú.
35. Inostroza, L; Castro, A; Hernández, E; Carhuapoma, M; Yuli, R; Collado, A; Córdova, J. 2015. “Actividad antioxidante de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua) y su aplicación como colorante para yogurt” Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2 Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación en Bacteriología Alimentaria – CLEIBA. Lima Perú.
36. Jacques, CA; Pertuzatti, PB; Barcia, MT; Zambiasi, RC y Chim, JF .2010. Estabilidad de los compuestos bioactivos en pulpa congelada de zarzamora (*Rubus fruticosus*) CV. Tupy. CV. Tupy. CV. Tupy. CV. Tupy. CV. Tupy. CV. Tupy. Química Nova, 33 (8), 1720 8), 1720 8), 1720 8), 1720 8), 1720 8), 1720 mi 1725 .
37. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc Tecnol Aliment; 25(4): 726-32.

38. Leyva, D. 2009. Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Tesis de pregrado para optar el título de Ingeniero en Alimentos, Facultad de Ingeniería en Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México, p. 19,34 – 50,41,45.
39. Lopez, W y Trujillo S. 2010. Obtención de colorantes naturales a partir de cáscara *Allium cepa* (cebolla blanca y morada) y Raíz de *beta vulgaris* (Remolacha), para su aplicación en la industria textil. Tesis de grado, San Salvador, el Salvador, Centro América.
40. Mamani, J; Arias, E. 2011. “Antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del Genero *Solanum* de pulpa azul y rojo” Sicuani- Cusco – Perú.
41. Manrique I, Arbizu C, Vivanco F, Gonzales R, Ramírez C, Chávez O, Tay D & D Ellis. 2013. *Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pav. Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 122 p.
42. Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. 2015. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Journal of food science*, 80(11).
43. Marina, L. 2014. obtención de extractos de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizados como antioxidantes y colorante en la industria alimentaria Tesis, Buenos Aires-Argentina.
44. Markakis, P. 1982. *Stability of Anthocyanins in Foods*. En: *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press. U.S.A., 3 (5).
45. Márquez, G. 2011. Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinífera* L. c.v. "red globe" cultivados en Perú. Tesis de postgrado para optar al grado académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, p. 38 – 54,67.
46. Martínez, H. 2015. “Técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas en materias primas de la región Ayacucho” Ayacucho – Perú.
47. Menéndez, W. 2008. Obtención de colorante para el uso en yogurt a partir de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y del mortiño (*Vaccinium mytillus* L.).

- Tesis de grado de la Facultad de Ingeniería de Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
48. Meza, G.; Cortes, H.; Zela, G. y Gonza, V. 1997. Cultivo de mashua. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco. Centro de investigación en cultivos andinos. Asociación Arariwa. IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos.
 49. Nayhua, C.M. 2017. Obtención de colorante natural a partir de la cáscara de tuna púrpura (*opuntia ficus-indica*) por el método de extracción sólido-líquido para su aplicación en la industria alimentaria. Tesis Puno Perú.
 50. National Research Council 1989. Lost crops of the incas: little know plants of the andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press. Washington D.C.
 51. Ortega, L. 1992. Usos y valor nutritivo de los tubérculos andinos. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y Agroindustria (INIAA). Programa de Investigación de Cultivos Andinos (PICA).
 52. Pertuzatti, P. B., Sganzerla, M., Jacques, A. C., Barcia, M. T., & Zambiasi, R. C. 2015. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. LWT-Food Science and Technology, 64(1), 259-263.
 53. Pinedo, R. 2015. "Niveles de fertilización en dos variedades de maíz morado (*Zea mays .L*) en la localidad de Canaan Ayacucho. Tesis. Lima Peru.
 54. Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. 2001. Antioxidantes de los alimentos, Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia Zaragoza.
 55. Quintero, R, Mariano, G Y Lopez, A, 2002, "Biotecnología alimentaria" Editorial Limusa, Mexico, Mexico.
 56. Quelal, M. 2012. Obtención de rodajas fritas "chips" de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) aplicando la tecnología de fritura. Tesis de pregrado para optar el título de Ingeniera de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Ingeniería Carrera de Ingeniería de Alimentos, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador, p. 14.
 57. Ramallo, Z. 1999. Diseño de una planta procesadora de harina de Isaño como base de la alimentación porcina. Testis. Universidad Privada de Bolivia. Bolivia.

58. Ramos, R. 2011. Evaluación de la capacidad antioxidante de productos tradicionales de la región “granadilla, ginda, habas, quinua, kiwicha, tuna, tumbo y yacon” (Tesis Para Optar El Título De Ingeniero En Industrias Alimentarias), Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo.
59. Rapisarda, P; Fanella, F, Macarone, E. 2000. Reliability of Analytical Methods for determining Anthocyanins in Blood Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2249 - 2252.
60. Rojas, D. N. 2008. Evaluación del contenido de vitamina C, Fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades pera, regional roja y regional blanca. *Memorias*.
61. Ruiz, B. 2009. Propiedades Antioxidantes de los productos de la reacción de Maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales. Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada.
62. Salas, F. 1998. Procesamiento de raíces y tubérculos andinos: Fascículos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Recuperado en: http://cipotato.org/library/pdfdocs/RTA56931.pdf?set_language=es&cl=es
63. Santacruz, L. 2011. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de postgrado para optar al grado de Maestría en Ciencias Química, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, p. 10,35 - 55.
64. Scalbert, A. y Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The journal of nutrition*, 130, 2073-2085.
65. Tapia, M. 2012. Obtención de rodajas fritas “Chips” de mashua (*tropaeolum tuberosum*) aplicado a la tecnología de fritura. Trabajo para obtener el título de ingeniero de alimentos. Universidad tecnológica Equinoccial. Quito, Ecuador.
66. Taipe, L. 2017, “Fenoles totales y actividad antioxidante en mashua (*Tropaeolum Tuberosum*) en estado fresco, soleado y cocido de las variedades amarillo zapallo y negra” Tesis, Huancayo – Perú.
67. Temoche, M., Campos, D., Chirinos, R. y Cisneros, L. 2004. Evaluación de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante presente en 30 genotipos de mashua. *Revistas Científicos UNALM*.

68. Timberlake, CF. 1980. Antocyanins- Occurrence, Extraction and Chemistry. Food Chem.;5(1) 69-80.
69. Tomás-Barberán, FA.; Gil, M.I.; Paedar Cremin, A L.; Waterhouse, B.; Hess-Pierce, L.; Kader. A. 2001. "HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums". Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol.49, pp.4748- 4760
70. Valdebenito A. 2005. Antioxidantes como transferentes de cadena en la polimerización de monómeros vinílicos. Tesis Doc quim. Chile. Universidad de Santiago de Chile.
71. Vera de Rosso V, Mercadante A. 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. Innovative Food Science and Emerging Technologies,8(3): 347-52.
72. Vinci, G., Botrè, F., y Mele, RG 1995. El ácido ascórbico en frutas: un cromatográfica líquida investigación gráfica. investigación gráfica. investigación gráfica. investigación gráfica. investigación gráfica. Química de los Alimentos, 53, 211 mil 214.
73. Waterhouse AL. 2002. Wine Phenolics. Ann N Y Acad Sci
74. Wrolstad R E. 2000. Anthcyanins. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. Natural Food Colorants. New York, N.Y.:Marcel Dekker, Inc.;2000.p.237-252.
75. Wrolstad, 2004, Anthocyanin Pigments: bioactivity and coloring properties. Food Sci. 69(5): C419-C425.
76. Yong Ju Z, Howar LR. 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. J Agric Food Chem, (51) 51(18): 5207-13.

ANEXOS

Anexo 1a. Análisis estadístico para pH

Resumen estadístico para pH

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M1	3	6,19	0,0458258	0,740319%	6,14	6,23
M2	3	6,21	0,03	0,483092%	6,18	6,24
M3	3	6,28	0,02	0,318471%	6,26	6,3
Total	9	6,22667	0,0502494	0,807003%	6,14	6,3

ANOVA para pH por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0134	2	0,0067	5,91	0,0381
Intra grupos	0,0068	6	0,00113333		
Total (Corr.)	0,0202	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para pH

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M1	3	6,19	X	M1-M2		-0,02
M2	3	6,21	XX	M1-M3	*	-0,09
M3	3	6,28	X	M2-M3		-0,07

*Indica una diferencia significativa

Anexo 1b. Análisis estadístico para sólidos solubles

Resumen estadístico para sólidos solubles

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	5,33333	0,51316	9,62175%	4,9	5,9
M2	3	2,76667	0,251661	9,09619%	2,5	3,0
M3	3	6,03333	0,152753	2,53181%	5,9	6,2
Total	9	4,71111	1,51859	32,2342%	2,5	6,2

ANOVA para sólidos solubles por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17,7489	2	8,87444	76,07	0,0001
Intra grupos	0,7	6	0,116667		
Total (Corr.)	18,4489	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para sólidos solubles.

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	3	2,77	X	M1-M2	*	2,57
M1	3	5,33	X	M1-M3		-0,7
M3	3	6,03	X	M2-M3	*	-3,27

*Indica una diferencia significativa

Anexo 1c. Análisis estadístico para acidez titulable

Resumen estadístico para acidez titulable

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M1	3	0,316667	0,0351188	11,0902%	0,28	0,35
M2	3	0,293333	0,051316	17,4941%	0,25	0,35
M3	3	0,306667	0,051316	16,7335%	0,25	0,35
Total	9	0,305556	0,0415665	13,6036%	0,25	0,35

ANOVA para acidez titulable por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,000822222	2	0,000411111	0,19	0,8319
Intra grupos	0,013	6	0,00216667		
Total (Corr.)	0,0138222	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para acidez titulable.

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	3	0,29	X	M1-M2		0,0233
M3	3	0,31	X	M1-M3		0,01
M1	3	0,32	X	M2-M3		-0,0133

Anexo 1d. Análisis estadístico para grasa

Resumen estadístico para grasa

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	0,706667	0,0896289	12,6833%	0,65	0,81
M2	3	0,636667	0,0251661	3,95279%	0,61	0,66
M3	3	0,596667	0,100664	16,8711%	0,49	0,69
Total	9	0,646667	0,0838153	12,9611%	0,49	0,81

ANOVA para grasa por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0186	2	0,0093	1,48	0,2995
Intra grupos	0,0376	6	0,00626667		
Total (Corr.)	0,0562	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para grasa.

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M3	3	0,60	X	M1-M2		0,07
M2	3	0,64	X	M1-M3		0,11
M1	3	0,71	X	M2-M3		0,04

Anexo 1e. Análisis estadístico para humedad

Resumen estadístico para humedad

MUESTR A	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M1	3	87,83	0,373631	0,425402%	87,43	88,17
M2	3	89,06	1,50103	1,68542%	87,96	90,77
M3	3	86,1933	0,42395	0,491859%	85,74	86,58
Total	9	87,6944	1,48131	1,68917%	85,74	90,77

ANOVA para humedad por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12,4094	2	6,20468	7,24	0,0252
Intra grupos	5,14487	6	0,857478		
Total (Corr.)	17,5542	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para humedad

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M3	3	86,19	X	M1-M2		-1,23
M1	3	87,83	XX	M1-M3		1,64
M2	3	89,06	X	M2-M3	*	2,87

*Indica una diferencia significativa

Anexo 1f. Análisis estadísticos para ceniza

Resúmen estadístico para cenizas

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M1	3	4,96333	0,213854	4,30867%	4,83	5,21
M2	3	4,71667	0,119304	2,5294%	4,62	4,85
M3	3	4,19667	0,115902	2,76177%	4,09	4,32
Total	9	4,62556	0,365004	7,89103%	4,09	5,21

ANOVA para cenizas por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,919022	2	0,459511	18,78	0,0026
Intra grupos	0,1468	6	0,0244667		
Total (Corr.)	1,06582	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para cenizas

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M3	3	4,20	X	M1-M2		0,25
M2	3	4,72	X	M1-M3	*	0,77
M1	3	4,96	X	M2-M3	*	0,52

*Indica una diferencia significativa

Anexo 2a. Análisis estadístico para antocianinas

Resumen estadístico para antocianinas

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	0,061	0,00138924	2,27745%	0,0594	0,0619
M2	3	0,0590333	0,00125831	2,13152%	0,0577	0,0602
M3	3	0,113033	0,00686246	6,07118%	0,1057	0,1193
Total	9	0,0776889	0,0267595	34,4444%	0,0577	0,1193

ANOVA para antocianinas por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00562734	2	0,00281367	166,80	0,0000
Intra grupos	0,000101213	6	0,0000168689		
Total (Corr.)	0,00572855	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para antocianinas

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	3	0,0590	X	M1-M2		0,0020
M1	3	0,061	X	M1-M3	*	-0,0520
M3	3	0,1130	X	M2-M3	*	-0,054

*Indica una diferencia significativa

Anexo 2b. Análisis estadístico para polifenoles totales

Resumen estadístico para polifenoles totales

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	308,06	22,2123	7,21039%	282,69	324,01
M2	3	276,87	7,1363	2,57749%	268,73	282,05
M3	3	365,543	14,0476	3,84293%	349,52	375,74
Total	9	316,824	41,2665	13,025%	268,73	375,74

ANOVA para polifenoles totales por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12140,1	2	6070,05	24,55	0,0013
Intra grupos	1483,3	6	247,216		
Total (Corr.)	13623,4	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para polifenoles totales

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	3	308,06	X	M1-M2		31,19
M1	3	276,87	X	M1-M3	*	-57,4833
M3	3	365,543	X	M2-M3	*	-88,6733

*Indica una diferencia significativa

Anexo 2c. Análisis estadístico para ácido ascórbico

Resúmen estadístico para ácido ascórbico

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	188,925	9,92585	5,25385%	179,9	199,556
M2	3	275,569	6,7194	2,43837%	267,837	279,991
M3	3	327,128	1,84951	0,565379%	325,63	329,195
Total	9	263,874	60,786	23,036%	179,9	329,195

ANOVA para ácido ascórbico por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	29265,3	2	14632,7	298,44	0,0000
Intra grupos	294,187	6	49,0311		
Total (Corr.)	29559,5	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para ácido ascórbico.

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M1	3	188,925	X	M1-M2	*	- 86,644
M2	3	275,569	X	M1-M3	*	-138,202
M3	3	327,128	X	M2-M3	*	-51,5583

*Indica una diferencia significativa

Anexo 3a. Análisis estadístico para actividad antioxidante-DPPH

Resumen estadístico para actividad antioxidante (DPPH)

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	298,95	21,1888	7,08774%	275,27	316,12
M2	3	256,77	29,5845	11,5218%	222,85	277,24
M3	3	391,123	35,6221	9,10765%	358,53	429,15
Total	9	315,614	64,7227	20,5069%	222,85	429,15

ANOVA para actividad antioxidante (DPPH) por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	28325,9	2	14162,9	16,39	0,0037
Intra grupos	5186,3	6	864,383		
Total (Corr.)	33512,2	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para actividad antioxidante por DPPH

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	3	256,77	X	M1-M2		42,18
M1	3	298,95	X	M1-M3	*	- 92,1733
M3	3	391,123	X	M2-M3	*	- 134,353

Anexo 3b. Análisis estadístico para actividad antioxidante-ABTS

Resumen estadístico para actividad antioxidante (ABTS)

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	Mínimo	Máximo
M1	3	244,367	3,26454	1,33592%	241,52	247,93
M2	3	180,907	3,70789	2,04961%	177,39	184,78
M3	3	267,68	6,1939	2,31392%	262,6	274,58
Total	9	230,984	39,0926	16,9243%	177,39	274,58

ANOVA para actividad antioxidante (ABTS) por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12100,3	2	6050,15	289,16	0,0000
Intra grupos	125,54	6	20,9234		
Total (Corr.)	12225,8	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para actividad antioxidante por ABTS

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	3	180,907	X	M1-M2	*	63,46
M1	3	244,367	X	M1-M3	*	-23,3133
M3	3	267,68	X	M2-M3	*	-86,7733

*Indica una diferencia significativa

Anexo 3c. Análisis estadístico para actividad antioxidante-IC50 DPPH

Resumen estadístico para IC50 DPPH

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
M1	2	0,00186657	0,000227867	12,2077%
M2	2	0,00202062	0,0000706711	3,49749%
M3	2	0,00200245	0,000255647	12,7667%
Total	6	0,00196322	0,000173564	8,8408%

ANOVA para IC50 DPPH por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,83493E-8	2	1,41746E-8	0,35	0,7314
Intra grupos	1,22273E-7	3	4,07577E-8		
Total (Corr.)	1,50622E-7	5			

Tukey HSD (95.0% de confianza) IC50 DPPH

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M1	2	0,0019	X	M1-M2		-0,0002
M3	2	0,0020	X	M1-M3		-0,0001
M2	2	0,0020	X	M2-M3		0,00002

Anexo 3d. Análisis estadístico para actividad antioxidante-IC50 ABTS

Resúmen estadístico para IC50 ABTS

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
M1	2	0,00113048	0,0000829981	7,34184%
M2	2	0,000873896	0,0000401538	4,5948%
M3	2	0,000768941	0,0000463162	6,02338%
Total	6	0,000924439	0,000172639	18,675%

ANOVA para IC50 ABTS por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,38375E-7	2	6,91875E-8	19,50	0,0191
Intra grupos	1,06462E-8	3	3,54873E-9		
Total (Corr.)	1,49021E-7	5			

Tukey HSD (95.0% de confianza) IC50 ABTS

Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M3	2	0,0008	X	M1-M2	*	0,0003
M2	2	0,0009	X	M1-M3	*	0,0004
M1	2	0,0011	X	M2-M3		0,0001

*Indica una diferencia significativa

Anexo 4a. Análisis estadístico para rendimiento de colorante

Resúmen estadístico para rendimiento de colorante

Muestra	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M1	2	58,05	0,212132	0,36543%	57,9	58,2
M2	2	49,20	0,141421	0,287442%	49,1	49,3
M3	2	64,00	0,707107	1,10485%	63,5	64,5
Total	6	57,0833	6,66946	11,6837%	49,1	64,5

ANOVA para rendimiento de colorante por muestra

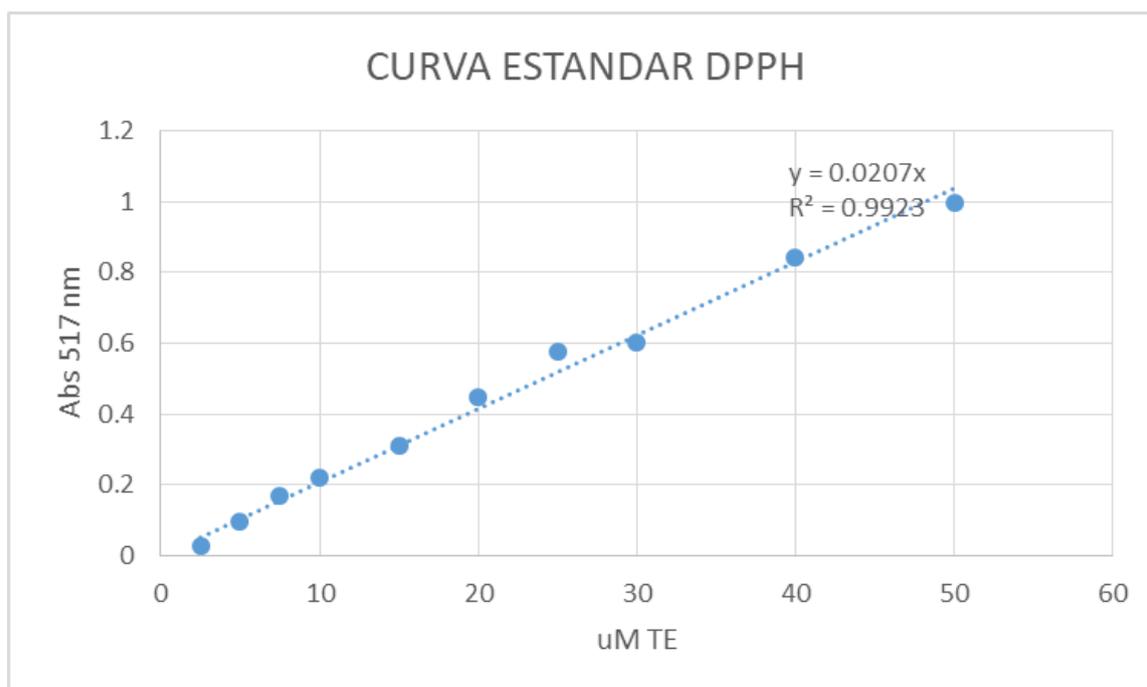
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	221,843	2	110,922	588,96	0,0001
Intra grupos	0,565	3	0,188333		
Total (Corr.)	222,408	5			

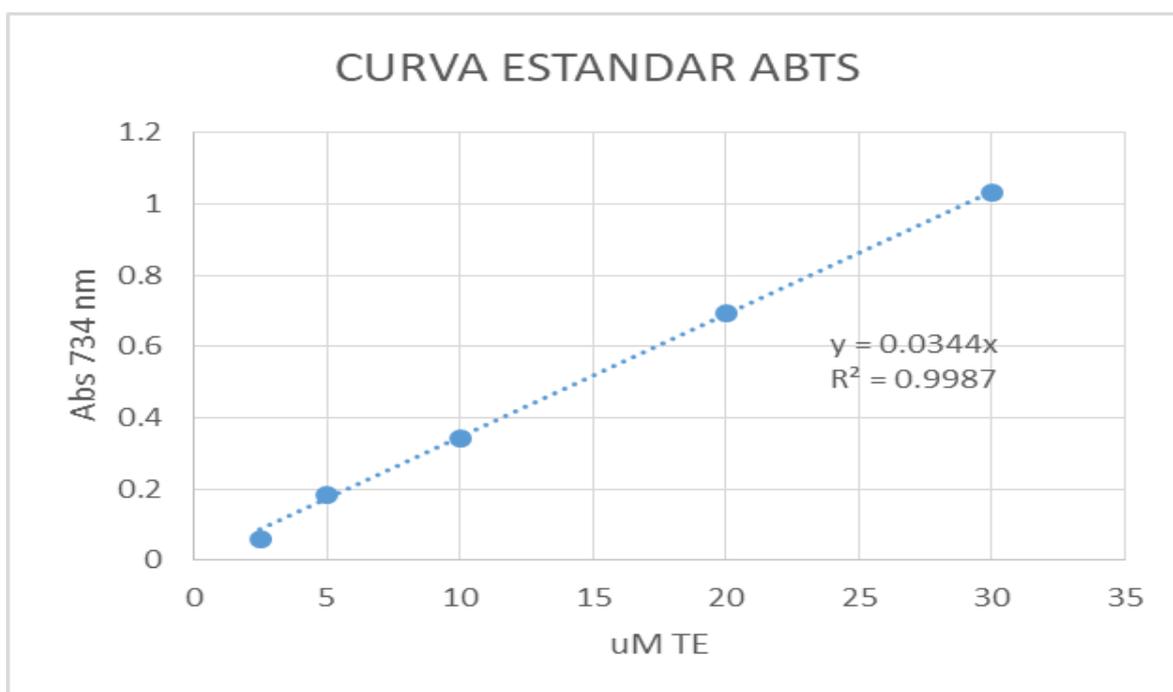
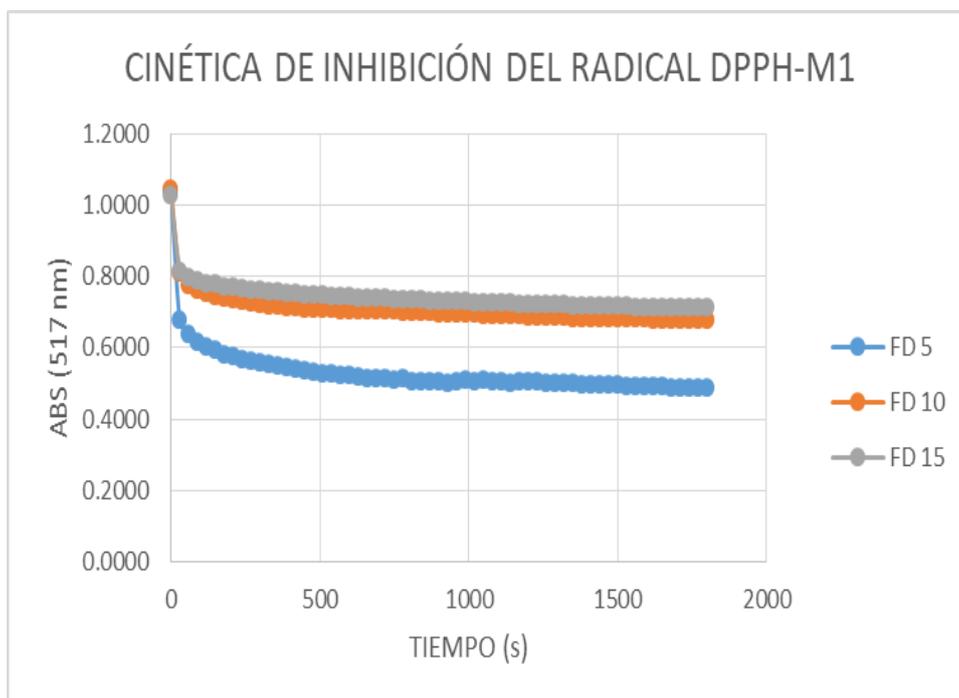
Tukey HSD (95.0% de confianza) rendimiento de colorante.

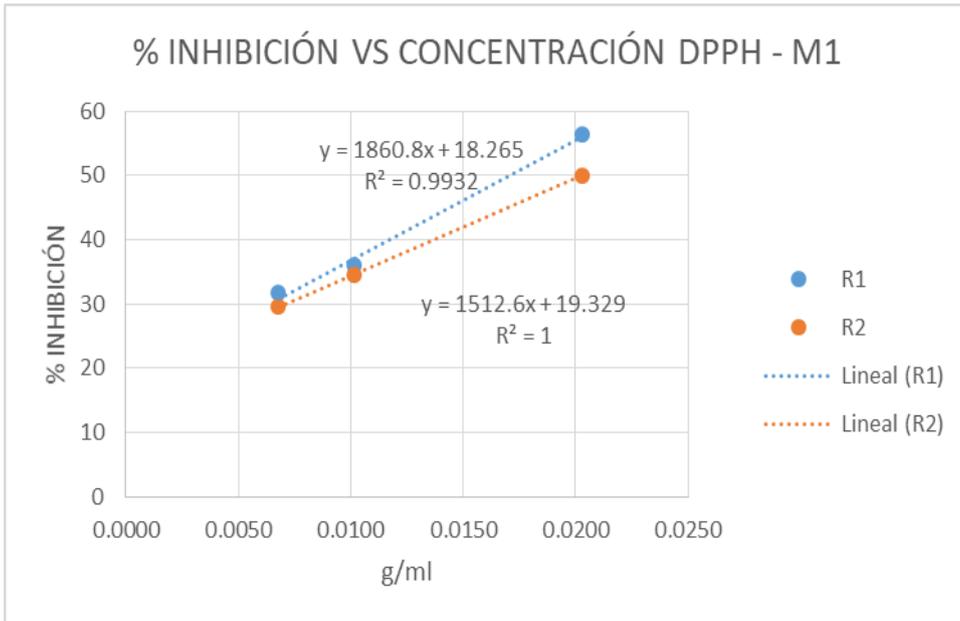
Muestra	Caso	Media	Grupos homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
M2	2	49,20	X	M1-M2	*	8,85
M1	2	58,05	X	M1-M3	*	-5,95
M3	2	64,00	X	M2-M3	*	-14,8

*Indica una diferencia significativa

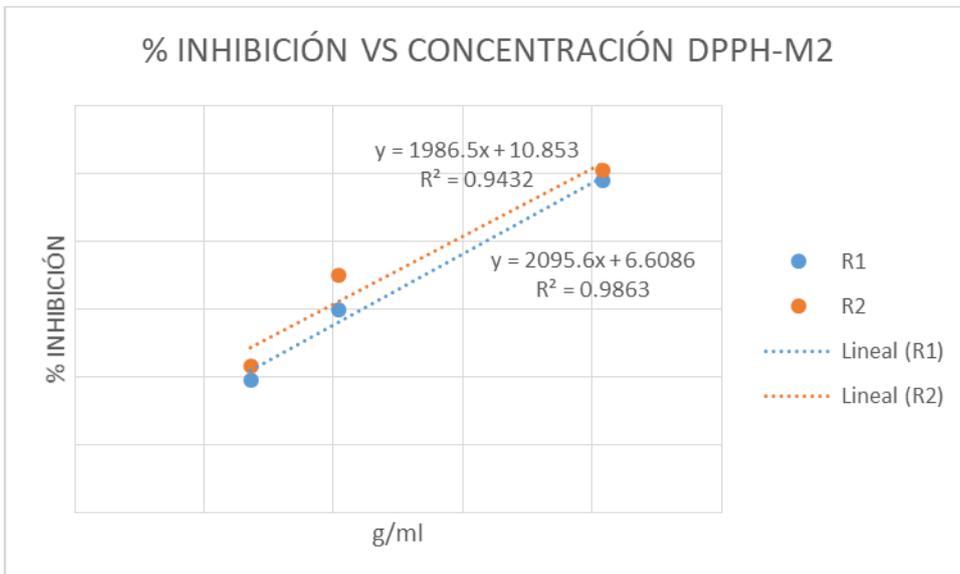
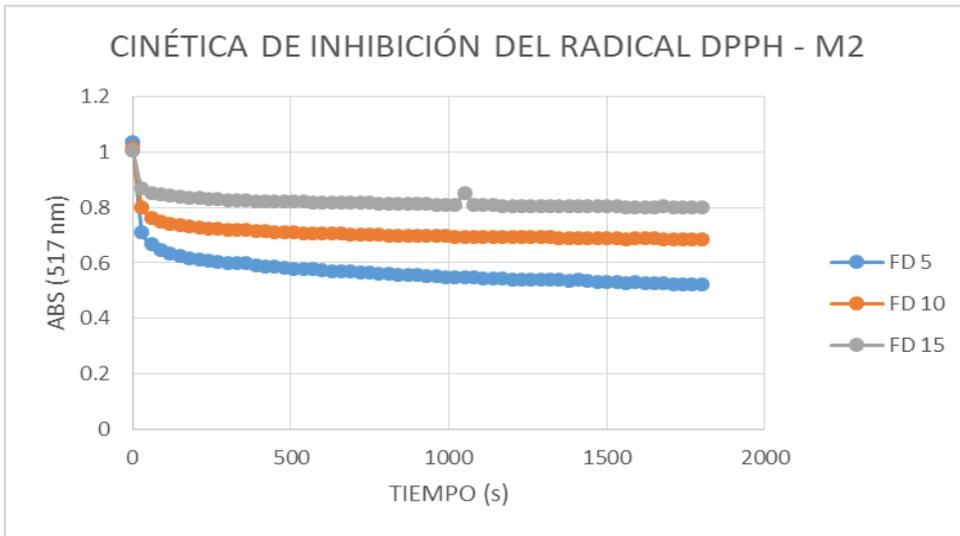
Anexo 5a. Curva estándar para DPPH



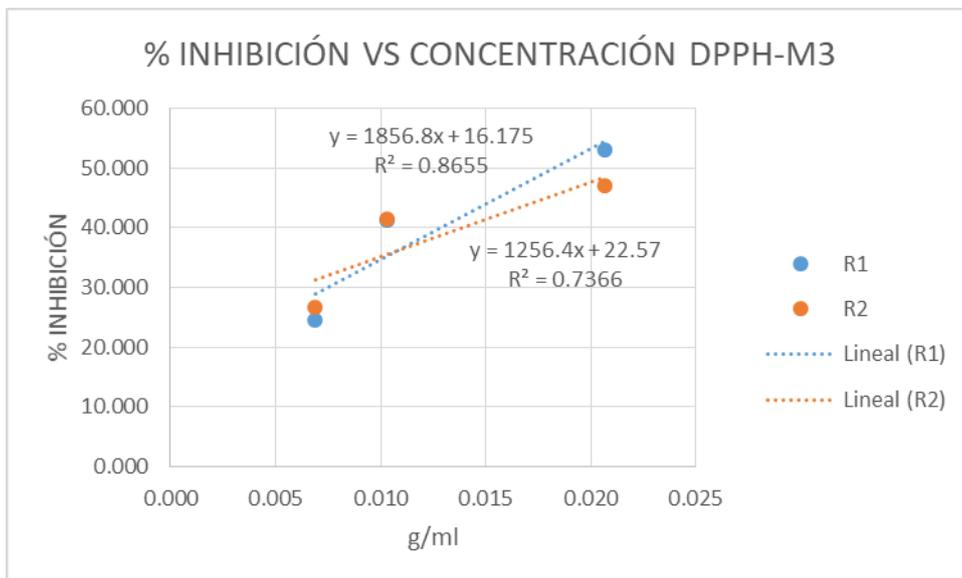
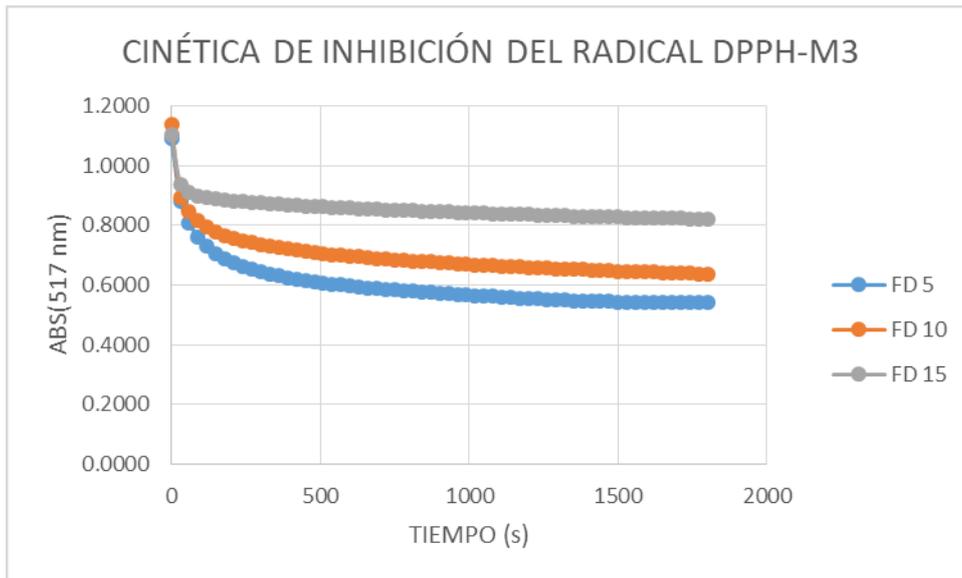
Anexo 5b. Curva estándar para ABTS**Anexo 6a.** Actividad antioxidante IC50 DPPH- M1



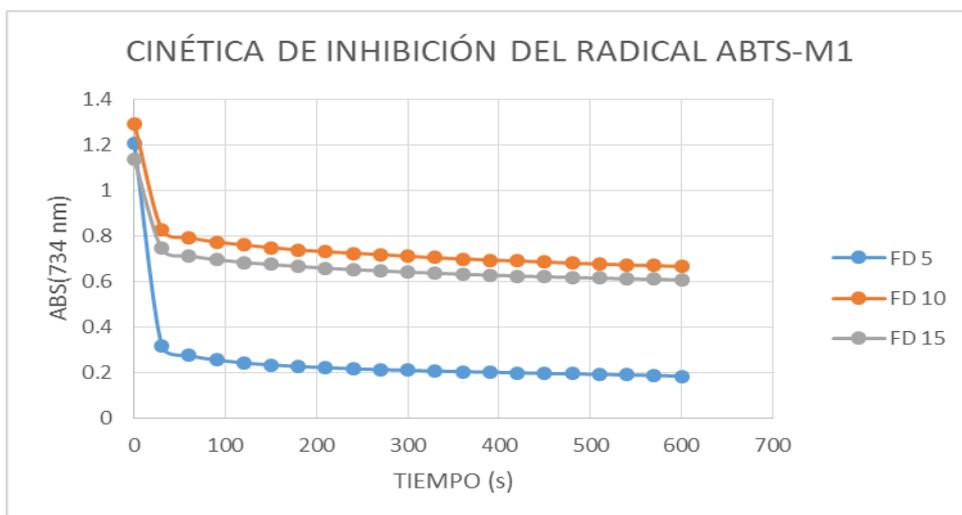
Anexo 6b. Actividad antioxidante IC50 DPPH- M2

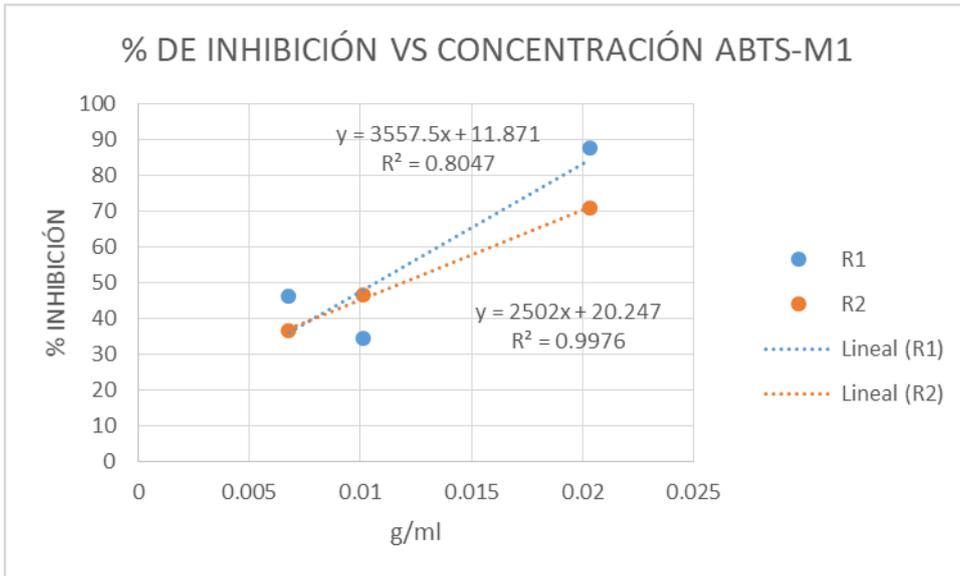


Anexo 6c. Actividad antioxidante IC50 DPPH- M3

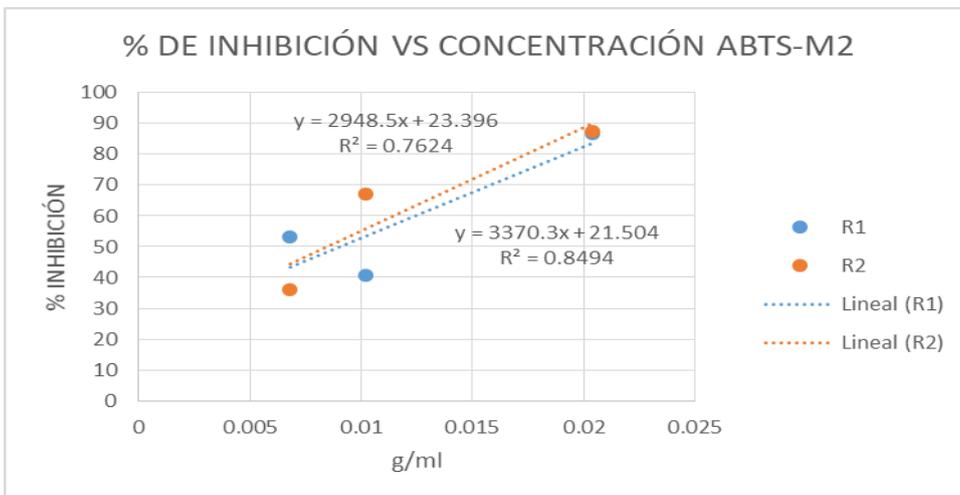
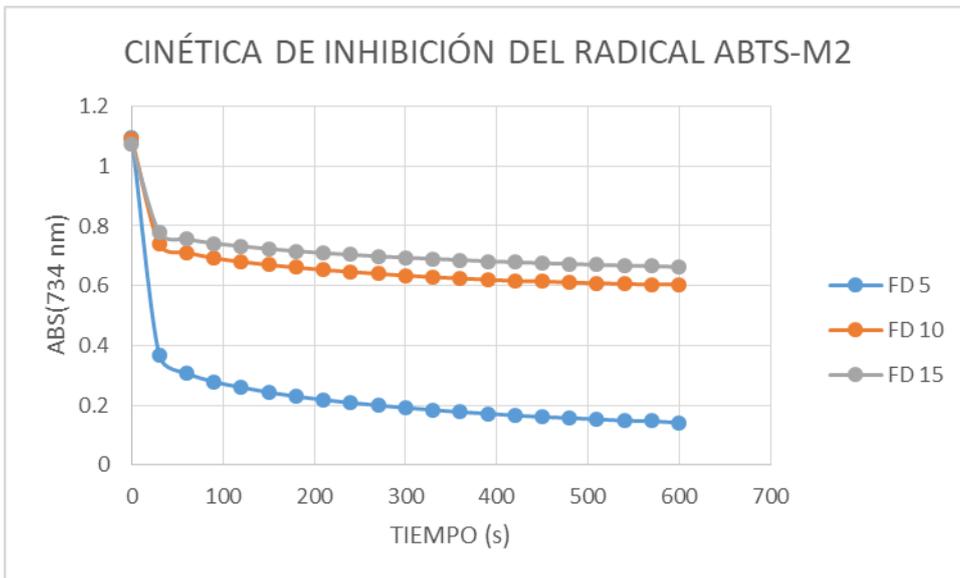


Anexo 6d. Actividad antioxidante IC50 ABTS- M1

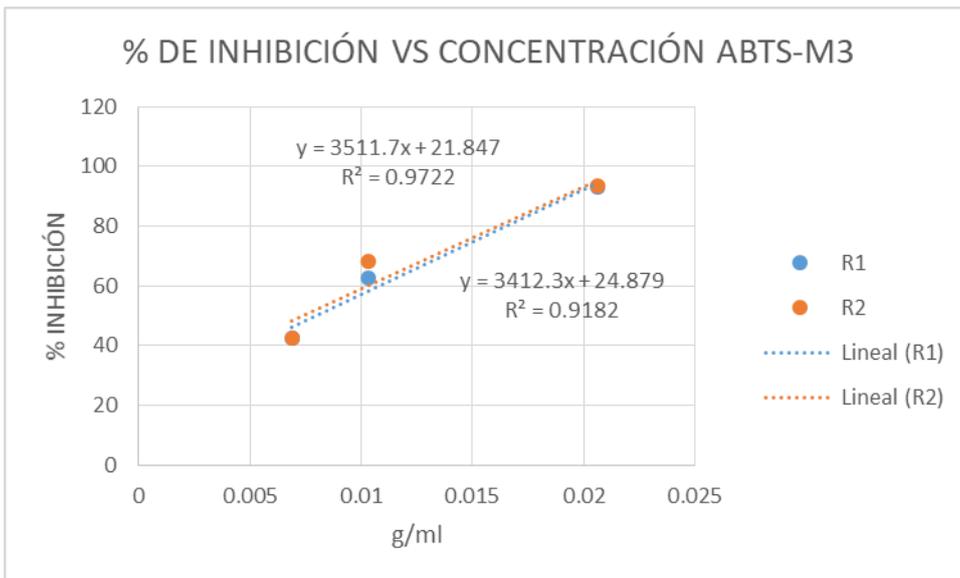
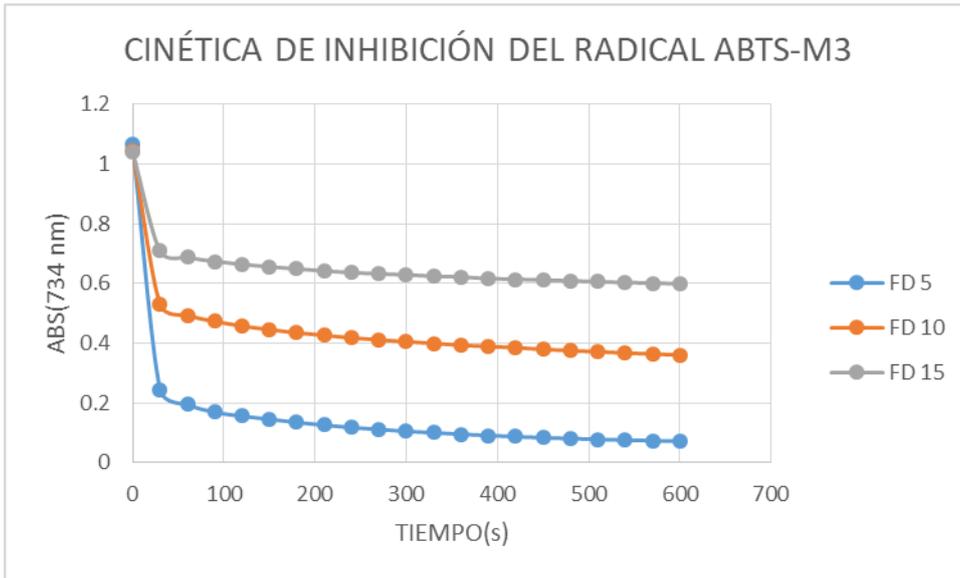


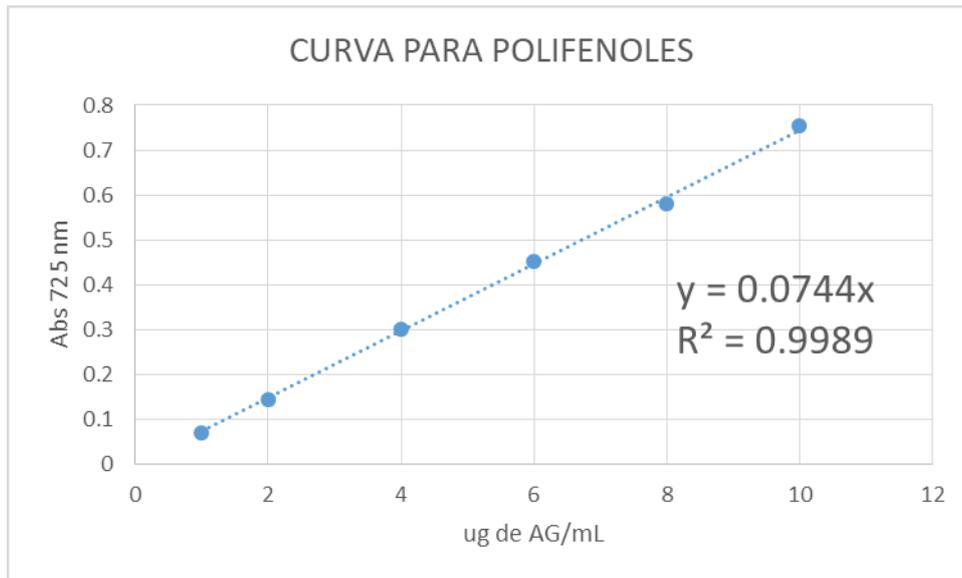


Anexo 6e. Actividad antioxidante IC50 ABTS- M2



Anexo 6f. Actividad antioxidante IC50 ABTS- M3



Anexo 7a. Curva estándar para polifenoles**Anexo 8a.** Ubicación de las muestras de la mashua negra a diferentes altitudes.**M1:** Ubicado a 4039 msnm, en el C.P. San Joaquín, San Rafael, Ambo –Huánuco



M2: Ubicado a 3814 msnm, en Ayapitec, Chavinillo, Yarowilca – Huánuco.



M3: Ubicado a 3463 msnm, en Sillapata, Dos de Mayo –Huánuco.

Anexo 9a. Caracterización físico química en mashua negra.



Recogiendo las muestras.



La mashua negra de las tres altitudes.



Mashua rayada de las tres muestras.



Filtrado de las muestras



El potenciómetro (acidez titulable y pH)



Muestras secas en la campana



Retiro de las muestras de la estufa.



Extracción de grasa por soxhlet.

Anexo 9b. Determinación de los compuestos bioactivos en mashua negra.

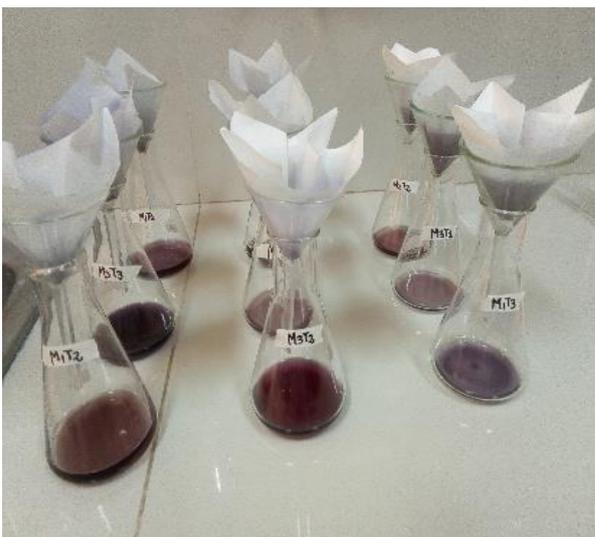
ANTOCIANINAS



Preparación de extractos.



Cámara de refrigeración a 4.3°C



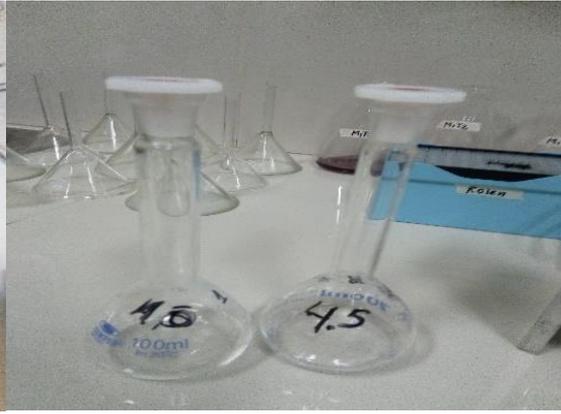
Filtración de las muestras.



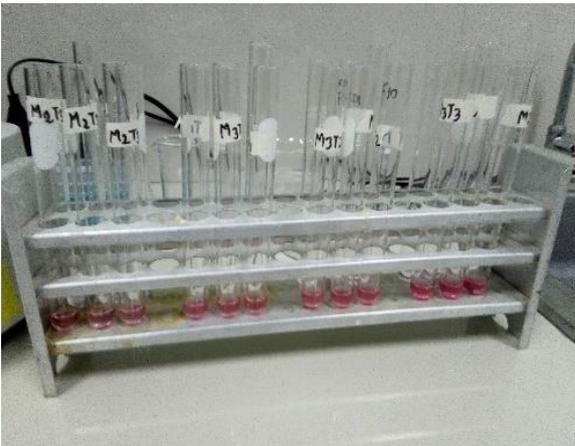
Pequeñas cantidades de muestras.



Centrifugación de las muestras.



Soluciones Buffer pH 1,0 y 4,5.



Coloración de las antocianinas.

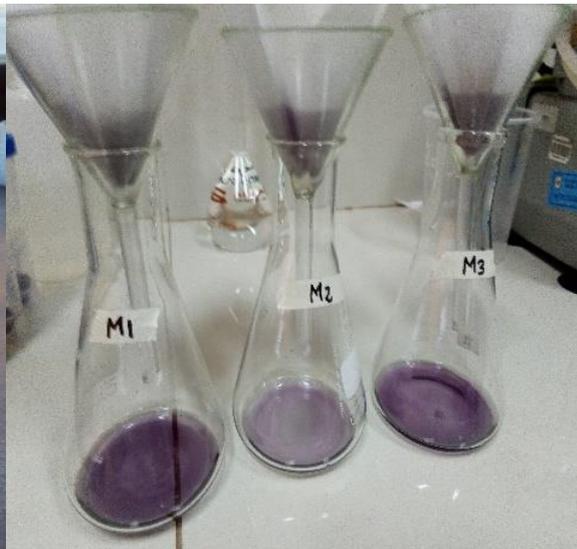


Lectura en el espectrofotómetro.

POLIFENOLES TOTALES



Preparación de los extractos.



Filtración de las muestras.



Cantidades pequeñas de muestra.



Coloración de los polifenoles.

ÁCIDO ASCÓRBICO



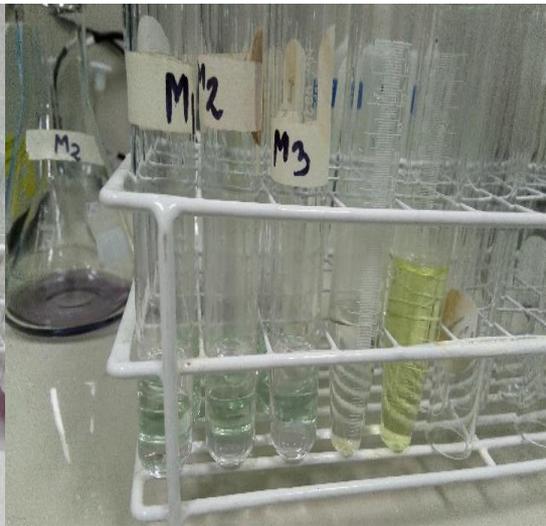
Agua más ácido acético.



Preparación de agua ultrapura.



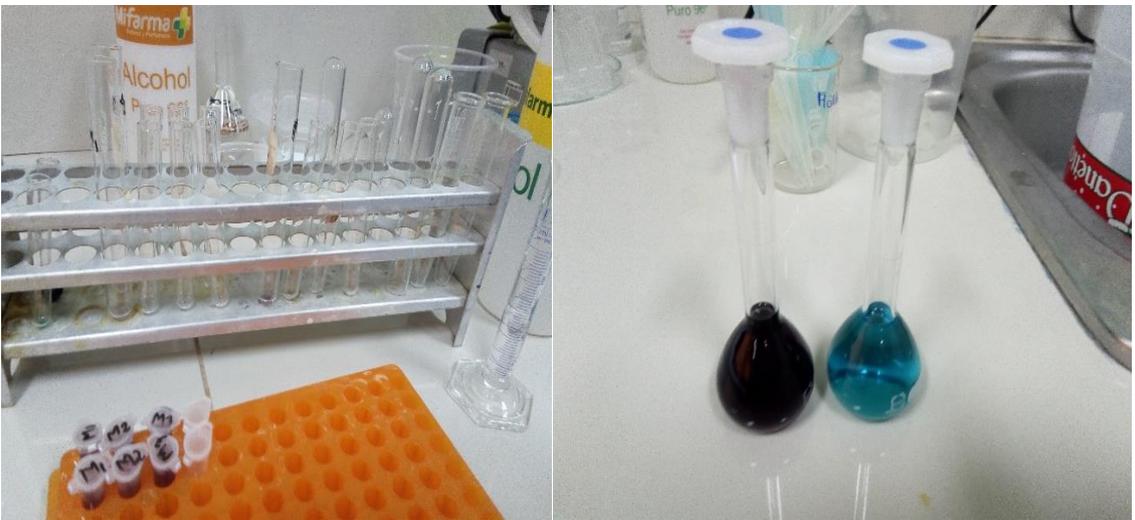
Filtración de las muestras.



Coloración del ácido ascórbico.

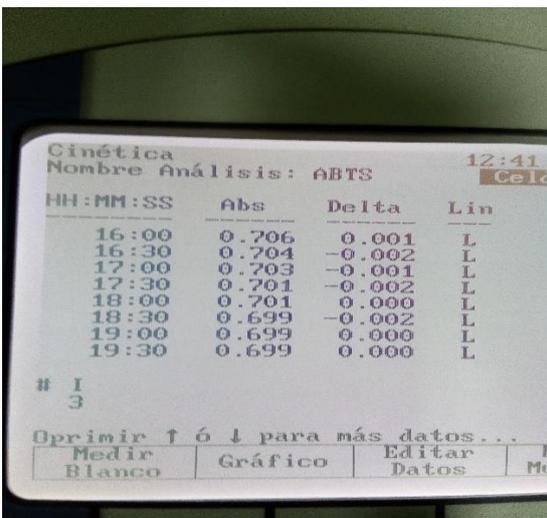


Preparación de las muestras.

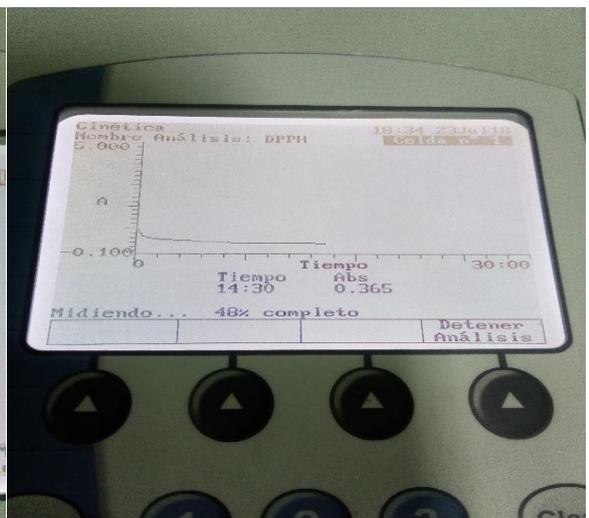
Filtros para HPLC de 0,22 μ m.**Anexo 9c.** Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS.

Muestras en pequeñas cantidades.

DPPH (moradito) y ABTS (verde)



La lectura en el espectrofotómetro ABTS



La curva del DPPH por tiempos.

Anexo 9d. Rendimiento de colorante en mashua negra.



Centrifugadora modelo Rotina 380.



Centrifugando las muestras.



Muestras centrifugadas.



Muestras (acidificadas) centrifugadas.



Realizando el baño maría a 40°C.



Concentración de colorante.