



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación *in vitro/in vivo* de propiedades antioxidantes de clones promisorios de papa criolla (*Solanum phureja*)

Andrea Elisa García Ramírez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2011

Evaluación *in vitro/in vivo* de propiedades antioxidantes de clones promisorios de papa criolla (*Solanum phureja*)

Andrea Elisa García Ramírez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Ph.D. Luis Fernando Ospina G.

Codirector):

Ph.D. Claudia Ariza Nieto

Grupo de Investigación:

Productos Bioactivos de plantas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2011

(Dedicatoria o lema)

A Alison García, Felipe Vogelsang y a la memoria de mis Abuelos Hernando Ramírez y Jaime García, que estoy segura, me cuidan todos los días de mi vida.....

“Intenta no volverte un hombre de éxito, sino un hombre de valor”.

Albert Einstein

Agradecimientos

Gracias a Dios que me ha dado la fuerza, la paciencia y la voluntad para sacar adelante uno de los retos más difíciles que me he propuesto.

Al grupo de Investigación de Nutrición de CORPOICA especialmente a la Dra. Claudia Ariza que apoyó incondicionalmente esta investigación, contando con su ayuda y experiencia en mi proceso de formación como investigadora.

Al Dr. Luis Fernando Ospina y Marcela Aragón del departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, quienes me acogieron en su grupo de investigación, me introdujeron al maravilloso mundo de las Ciencias Farmacéutica, me enseñaron conceptos importantes, además de las buenas y provechosas jornadas en el laboratorio y en el bioterio,

A la Dra Magnolia Ariza que desde la distancia y gracias a sus buenas relaciones en Cornell, me envió mucho apoyo técnico, académico y emocional.

A mis compañeros y amigos de CORPOICA, Charly, Tati, Fabi, Vienvy Juanito y Yessy que me acompañaron y ayudaron en muchos momentos de este proceso. “A Mr. Hugh (Hugo Jiménez) para enmendar una deuda de mi trabajo de pregrado” a Dany Rodriguez, por su gran ayuda en los muestreos, a todos los colaboradores del laboratorio de Nutrición del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR por financiar gran parte de esta investigación y a CORPOICA porque es mi casa, por acogerme durante estos años y la cual ha sido una importante escuela para mí.

A mi familia por apoyarme en todo momento y a cualquier hora.

Y a Felipe Morto, que ha vivido conmigo este proceso desde el inicio y ha sido la base emocional que necesitaba cumplir finalmente con este gran paso en mi vida profesional.

Resumen

La papa es un alimento básico y es fuente de compuestos con actividad antioxidante, estas sustancias en pequeñas concentraciones son capaces de reaccionar con las especies Reactivas de Oxígeno ERO, implicadas en numerosos acontecimientos relacionados con enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento, para proteger el sustrato y combatir este daño celular. En este trabajo se estudiaron 22 clones promisorios de papa *Solanum phureja* con el fin de evaluar sus propiedades *in vivo* / *in vitro*. Para este fin se desarrollaron 3 etapas, la primera consistió de un análisis de ácido clorogénico, ácido ascórbico y fenoles totales, la segunda parte consistió en llevar a cabo la capacidad antioxidante *in vitro* de los clones de papa a través de pruebas como FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), luego se seleccionaron 10 clones y se analizó la captación de radicales hidroxilo, superóxido y peróxido, donde se destacaron los clones el clon CO56 y CO64 por su captación de radicales. En la tercera fase se desarrollaron dos experimentos *in vivo*, en el primero se evaluó el estatus antioxidante de la papa con un modelo de hepatotoxicidad inducido por CCl₄ en ratas Wistar y en el segundo se evaluó la suplementación de materiales de papa como aditivo nutracéutico en sistemas de alimentación de pollos de engorde, realizando las pruebas de FRAP y TABARS. Los resultados mostraron al ácido clorogénico en rangos de 126,20 a 627,49 µg/100g BS, ácido ascórbico entre 44,90 a 114,93 mg/100g BS y fenoles totales entre 238,34 y 426,96 mg EAG/100g BS donde se presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre clones y correlaciones con respecto al color de la cáscara. En cuanto a la capacidad antioxidante *in vitro* se encontró que para FRAP se obtuvieron rangos entre 75,14 – 198,14 mg ET/100g BS, para ABTS de 70,54 a 101,55 µg ET /g BS, en DPPH 21,137- 178,50 µg ET/g BS y ORAC 21,68 - 47,49 µmol ET/g BS. Para los 10 clones se obtuvo captación de radicales peróxido entre 11-28%, radicales hidroxilo entre 14-74%, $P < 0.01$) y radicales superóxido de 34 a 45%. En el ensayo *in vivo* con ratas, se tuvo un potente efecto protector contra el estrés oxidativo y el daño hepático agudo, según lo

revelado por la restauración de las actividades enzimáticas de SOD y CAT, además de la disminución de la oxidación de lípidos y proteínas. También, se encontró una reducción de los niveles séricos de las enzimas hepáticas ALT, AST y la mejora de los cambios histopatológicos. El segundo ensayo *in vivo* con pollos, se estableció que la papa aumenta la actividad FRAP en 25% en plasma de pollos por la presencia de compuestos fenólicos y que podría usarse como fuente de antioxidantes naturales dentro de una dieta ya que se evidencio la disminución de la peroxidación lipídica con respecto a una dieta sin suplementación (control) en pierna (32,80 mg MDA/g BS vs 42,68 mg MDA/g BS) y en pechuga (3,66 mg MDA/g BS vs 9,35 mg MDA/g BS). Este estudio logró confirmar la actividad antioxidante *in vitro/ in vivo* de clones de papa *Solanum phureja* según la concentración de compuestos presentados y su efecto hepatoprotector e inhibidor de la peroxidación lipídica.

Palabras clave: *Solanum phureja*, Radicales libres, Capacidad antioxidante, Hepatotoxicidad, Peroxidación lipídica.

Abstract

The potato is part of normal diet and a source of antioxidant compounds. These substances, in small concentrations are able to react with Reactive Oxygen Species ROS, implicated in a lot of events related to cardiovascular diseases and aging process to protect the substrate and fight cell damage. In this work we studied 22 clones of potato *Solanum phureja* promising to evaluate its properties *in vivo / in vitro*. To order you developed is 3 stages: the first consisted of an analysis of chlorogenic acid, ascorbic acid and total phenols, the second part was carried out *in vitro* antioxidant capacity of potato clones through tests such as FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), then 10 clones were selected and analyzed for hydroxyl radical scavenging, superoxide and peroxy. In the third phase, two experiments were developed *in vivo*, the first evaluated the antioxidant status of potato with a model of CCl₄-induced hepatotoxicity in Wistar rats and in the second supplementation was evaluated as an additive material of potato nutraceutical systems supply of broilers, selected for testing FRAP and TBARS. The results showed to chlorogenic acid in range from 126,20 to 627,49 µg/100g DW, ascorbic

acid between 44,90 and 114,93 mg/100g DW and total phenols between 238,34 and 426,96 mg EAG/100g DW, when where significant differences ($p < 0.001$) between clones and correlation with respect to skin color. In the in vitro antioxidant capacity was found that for FRAP were obtained ranges between 75,14 to 198,14 mg ET/100g DW, ABTS from 70,54 to 101,55 ug ET /g DW, DPPH between 21,137 and 178,50 ug ET/g DW y ORAC from 21,68 to 47,49 $\mu\text{mol ET/g DW}$. For the 10 clones was obtained captation peroxy radicals between 11 and 28%, hydroxyl radicals between 14 and 74% ($P < 0.01$) and superoxide radicals from 34 to 45%. In vivo test in rats, there was a strong protective effect against oxidative stress and acute liver damage, as revealed by the restoration of the enzymatic activities of SOD and CAT, as well as decreased oxidation of lipids and proteins . Also, there was a reduction in serum levels of liver enzymes ALT, AST and improved the histopathological changes. The second in vivo assay with chicken, potato was established that FRAP activity increases by 25% in plasma of chickens by the presence of phenolic compounds and could be used as a source of natural antioxidants in a diet as is evidenced by the decrease of lipid peroxidation compared to a diet without supplementation (control) leg (32.80 mg MDA / g DW vs 42.68 mg BS MDA / g DW) and breast (3.66 mg MDA / g DW vs 9.35 BS mg MDA / g DW). This study allowed to confirm the antioxidant activity in vitro / in vivo of *Solanum phureja* potato clones according to the concentration of compounds present and their hepatoprotective effect and inhibitor of lipid peroxidation

Keywords: *Solanum phureja*, Free radicals, Antioxidant capacity, Hepatotoxicity, Lipid peroxidation

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen.....	VIII
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XV
Introducción	1
Objetivos.....	3
1 Marco teórico.....	4
1.1 Estrés oxidativo.....	4
1.2 Radicales libres.....	5
1.2.1 Radicales libres inorgánicos o primarios.....	6
1.2.2 Radicales libres orgánicos o secundarios.....	6
1.2.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.....	6
1.2.4 Efecto nocivo de los radicales libres	7
1.3 Alimentos funcionales	8
1.4 Papa <i>Solanum phureja</i>	9
1.5 Antioxidantes para prevenir oxidación lipídica en carne de pollo.....	11
1.6 Caracterización in vitro de radicales libres	13
1.6.1 Reacciones SET (Single Electron Transfer, SET) y reacciones (Hydrogen Atom Transfer, HAT) HAT	14
2 Composición química y Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i> de clones de <i>Solanum phureja</i> 16	
2.1 Metodología	17
2.1.1 Material vegetal	17
2.1.2 Descripción del color del tubérculo	17
2.1.3 Caracterización Química	19
2.1.3.1 Determinación del contenido de Ácido Clorogénico	19
2.1.3.2 Determinación del contenido de Ácido Ascórbico (vitamina C).....	20
2.1.3.3 Determinación del contenido de fenoles totales	21
2.1.3.4 Determinación de Carotenoides totales e individuales	21
2.1.4 Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i>	22
2.1.4.1 FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)	22
2.1.4.2 ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	23

2.1.4.3	DPPH (radical 2,2difetil-1-picrilhidrazil)	24
2.1.4.4	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	25
2.1.4.5	Captación del Radical Peroxilo (ROO•) Sistema: ABAP/LISOZIMA	26
2.1.4.6	Captación del Radical Hidroxilo generado en el sistema H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ /EDTA/ Ascorbato	27
2.1.4.7	Captación del anión superóxido generado por el sistema Hipoxantina/ Xantina Oxidasa	28
2.1.4.8	Análisis estadístico	30
2.2	Resultados y Discusión.....	30
2.2.1	Descripción del color del tubérculo.....	30
2.2.2	Caracterización Química	30
2.2.2.1	Determinación de ácido clorogénico, ácido ascórbico y fenoles totales ..	30
2.2.2.2	Determinación de carotenoides totales e individuales.....	33
2.2.2.3	Relación del color de la cáscara de papa con el contenido de compuestos 35	
2.2.3	Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i>	38
2.2.3.1	Determinación de la capacidad antioxidante FRAP, ABTS, DPPH y ORAC 38	
2.2.3.2	Captación del Radical Peroxilo, Hidroxilo y superóxido.....	43
2.3	Conclusiones	46
3	Evaluación del estatus antioxidante por <i>Solanum phureja</i> en ratas con síndrome hepatotóxico.....	48
3.1	Implementación del modelo de hepatotoxicidad inducida con Tetracloruro de Carbono (CCl ₄).....	49
3.1.1	Metodología	49
3.1.1.1	Protocolo Experimental.....	49
3.1.1.2	Tratamiento de muestras biológicas obtenidas	50
3.1.1.3	Estimación de parámetros bioquímicos en sangre.....	51
3.1.1.4	Cuantificación de proteínas.....	52
3.1.1.5	Determinación de marcadores de estrés oxidativo.....	53
3.1.1.6	Análisis Histopatológico	58
3.2	Resultados y Discusión.....	58
3.2.1	Estimación de parámetros bioquímicos en sangre.	58
3.2.2	Cuantificación de proteínas	60
3.2.3	Determinación de marcadores de estrés oxidativo.	61
3.2.3.1	Cuantificación de la capacidad antioxidante total plasmática mediante el método de la Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma").....	61
3.2.3.2	Índice de oxidación de proteínas: Cuantificación de grupos carbonilo de las proteínas.....	61
3.2.3.3	Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS	62
3.2.3.4	Cuantificación de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa SOD.	63
3.2.3.5	Cuantificación de la actividad enzimática de la catalasa	64
3.2.4	Análisis Histopatológico.....	65
3.3	Conclusión.....	67
4	Evaluación de la suplementación de materiales de papa como aditivo nutracéutico en sistemas de alimentación de pollos de engorde.....	68

4.1	Metodología	69
4.1.1	Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma")	72
4.1.2	Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS	72
4.2	Resultados y Discusión	74
4.2.1	Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma")	74
4.2.2	Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS	77
4.2.2.1	TBARS pierna-pernil de pollo	77
4.2.2.2	TBARS pechuga de pollo	79
4.3	Conclusiones	82
5	Conclusiones y recomendaciones generales	83
5.1	Conclusiones	83
5.2	Recomendaciones	83
	Bibliografía	85

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 2-1: Tabla de colores de la piel del tubérculo de papa.	18
Figura 2-2: Clones de papa <i>S. phureja</i> usados en este estudio	30
Figura 2-3: Contenido de fenoles totales en 14 alimentos (Navarre et al.,2011).....	33
Figura 2-4: Relación entre el color de la cáscara y el contenido de Ácido Clorogenico en los clones de papa <i>S. phureja</i>	36
Figura 2-5: Relación entre el color de la cáscara y el contenido de Ácido Clorogenico en los clones de papa <i>S. phureja</i>	36
Figura 2-6: Relación entre el color de la cáscara y el contenido de Fenoles totales en los clones de papa <i>S. phureja</i>	37
Figura 2-7: Relación entre el color de la cáscara y la capacidad antioxidante ORAC en ecotipos de <i>Solanum phureja</i>	41
Figura 2-8: Relación entre el color de la cáscara y la capacidad antioxidante ABTS en ecotipos de <i>Solanum phureja</i>	41
Figura 2-9: Relacion de la captacion del radical hidroxilo con el color de la cáscara.....	45
Figura 3-1: Esquema general del tratamiento de las muestras de hígado y plasma obtenidas de Ratas Wistar en el ensayo de hepatotoxicidad inducido por CCl ₄	51
Figura 3-2: Histopatología de hígados de rata en un experimento con CCl ₄	66

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 2-1: Color de la piel del tubérculo (abcd).....	18
Tabla 2-2: Gradiente de elución de la fase móvil ácido fórmico (0.1 %) y metanol al 100 % para la separación y cuantificación por UPLC de ácido clorogénico.....	19
Tabla 2-3: Gradiente de elución de la fase móvil ácido fórmico (0.1 %) y metanol al 100 % para la separación y cuantificación por UPLC de vitamina C.....	20
Tabla 2-4: Protocolo para la determinación de la captación del radical peroxilo por las muestras de papa en el sistema ABAP / Lisozima	26
Tabla 2-5: Protocolo para la determinación de la captación de radical hidroxilo por los clones de papa en el sistema H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ /EDTA/ Ascorbato	27
Tabla 2-6: Protocolo para determinar la actividad captadora del radical superóxido en el sistema xantina/ xantina oxidasa.....	29
Tabla 2-7: Contenido de compuestos con propiedades antioxidantes en clones de papa <i>Solanum phureja</i>	31
Tabla 2-8: Contenido de carotenoides totales e individuales en clones de papa.....	33
Tabla 2-9: Capacidad antioxidante de clones de papa.....	38
Tabla 2-10: Correlación entre los compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante ORAC	41
Tabla 2-11: Análisis de puntaje de los clones de papa con base en su actividad antioxidante.....	42
Tabla 2-12: Captación de radicales Peroxilo, Hidroxilo y Superóxido por clones de papa S, phureja.....	44
Tabla 2-13: Actividad de absorbancias con respecto al control en la captación de radicales Peroxilo, Hidroxilo y Superóxido por clones de papa S, phureja.....	44
Tabla 2-14: Correlaciones entre la captación de radicales hidroxilo con componentes y actividad antioxidante de clones de papa.	46
Tabla 3-1: Distribución de grupos en el ensayo de hepatotoxicidad inducido en ratas Wistar por CCl ₄	50

Tabla 3-2: Protocolo para la determinación de proteína en hígado y sangre	52
Tabla 3-3: Efecto de clones de papa sobre parámetros bioquímicos de ratas tratadas con CCl ₄	58
Tabla 3-4: Contenido de proteína en hígado de ratas tratadas con CCl ₄	60
Tabla 3-5: Marcadores de estrés oxidativo en ratas tratadas con CCl ₄	64
Tabla 3-6: Resultados de análisis histopatológico en hígados de rata tratados con CCl ₄ ...	65
Tabla 4-1: Capacidad antioxidante DPPH de los materiales de papa	69
Tabla 4-2: Capacidad antioxidante DPPH de los ingredientes de la dieta.....	71
Tabla 4-3: Porcentaje de inclusión de papa en dietas con diferente actividad de DPPH.....	71
Tabla 4-4: Contrastes ortogonales establecidos para evaluar el efecto antioxidante de la papa.....	73
Tabla 4-5: Contrastes del efecto de la papa sobre la capacidad antioxidante FRAP	75
Tabla 4-6: Contrastes del efecto de la papa sobre TBARS en pierna-pernil de pollo	77
Tabla 4-7: Contrastes del efecto de la papa sobre TBARS en pechuga de pollo	79

Introducción

Existe un gran número de patologías asociadas al estrés oxidativo entre ellas enfermedades degenerativas como la diabetes y la arterioesclerosis, donde las concentraciones de oxígeno se incrementan como producto de los procesos celulares. El oxígeno, al estar en capacidad de enlazarse por su par electrónico libre, puede llegar a desencadenar reacciones para dar origen a las denominadas especies de oxígeno reactivas (EOR), entre estas encontramos los radicales libres, iniciando con el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$), hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y especies no radicalarias como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), entre otros. Existen sustancias que actúan como defensas antioxidantes, estas pueden ser de primera línea como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GSH-Px); o de segunda línea como el ácido ascórbico, α tocoferol, glutatión (GSH) y carotenoides. También existen las sustancias provenientes de los productos naturales como los flavonoides, alcaloides, cumarinas, entre otras. Los nutrientes antioxidantes (polifenoles, betacaroteno, vitaminas como la E y la C y minerales como el selenio, el cobre y el zinc) constituyen uno de los principales recursos de la biología humana para contrarrestar los daños causados por los derivados del oxígeno. Los resultados de los primeros estudios epidemiológicos de tipo ecológico (Armstrong, 1975; Christensen *et al.*, 2008) sentaron las primeras hipótesis, relacionando ingesta de antioxidantes y protección frente a la enfermedad cardiovascular, el cáncer, las infecciones y la aparición de cataratas. Posteriormente, se han conocido múltiples trabajos de índole analítico sobre el estrés oxidativo, sus efectos en el organismo y el uso de antioxidantes (Katiyar *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 2008) que apoyan dichas hipótesis.

En la naturaleza se encuentran muchas especies de plantas que contienen estos metabolitos secundarios y que han sido motivo de investigación para su posterior uso en industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, entre otros. Una de las plantas más conocidas y cultivadas como producto básico de la canasta familiar colombiana y a nivel mundial es la papa, ocupando el quinto lugar en cuanto a consumo humano y el cuarto

lugar en cuanto al valor de la producción, después del maíz, el trigo y el arroz; es el producto de origen agrícola de mayor consumo per cápita en Colombia, con un promedio de 69.9 Kg/habitante/año. Dicho consumo se considera alto, ya que está por encima del promedio mundial (50 Kg/habitante) (MADR, 2007). En Colombia se cultivan comercialmente dos tipos de papa: *Solanum tuberosum* subespecie andígena (papa de año) y *Solanum phureja* o papa criolla; con esta última se siembran anualmente cerca de 7.000 ha. En el país se han generado más de 35 variedades mejoradas de papas pero tan solo cuentan con importancia comercial alrededor de 10.

Como otros tubérculos amiláceos, el gran valor como alimento de la papa es su contenido energético además el contenido de proteína es alrededor del 2% y se caracteriza por su alto contenido de minerales, ácido ascórbico y carotenos (Ariza *et al.*, 2008) y su potencial nutracéutico poco estudiado en Colombia. Teniendo en cuenta la importancia que representa este alimento en la nutrición, se desarrolló esta investigación cuyo objetivo fue evaluar la capacidad y actividad antioxidante *in vitro* / *in vivo* de clones de papa (*Solanum phureja*). Para esto fue necesario determinar el contenido de compuestos antioxidantes de los clones de papa, determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los mismos y evaluar la actividad antioxidante *in vivo* mediante un modelo animal con el fin de establecer correlaciones entre el contenido de compuestos de la papa y su capacidad antioxidante.

Objetivos

General

Evaluar la capacidad y actividad antioxidante *in vitro/in vivo* de clones promisorios de papa criolla (*Solanum phureja*).

Específicos

- Determinar compuestos antioxidantes en los clones de papa criolla *S. phureja*.
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los clones de *Solanum phureja*.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vivo* usando modelos animales al ser suplementados con *S. phureja*

1 Marco teórico

1.1 Estrés oxidativo

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), con los electrones que forman el enlace pi antienlazante con el mismo espín. Es decir en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción baja a la temperatura fisiológica. Sin embargo por reacciones químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. Por lo anterior, se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los efectos tóxicos que posee (Halliwell, 2000).

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen un desbalance entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Ames *et al.*, 1993).

1.2 Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman (Cheesman, *et al.*, 1996). Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalarias, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes: Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) (Beckman *et al.*, 1996)

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO•)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Anión superóxido (O₂⁻)
- Oxígeno singlete (¹O₂)
- Óxido nítrico (NO)
- Peroxilo (ROO•)
- Semiquinona (QH)
- Ozono O₃

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

1.2.1 Radicales libres inorgánicos o primarios.

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.

1.2.2 Radicales libres orgánicos o secundarios.

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas que actúan como radicales son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

1.2.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.

Se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, los hidroperóxidos orgánicos (Diplock, 1991). Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (Esposito *et al.*, 2000). Entre estas sustancias y agentes es conocida ampliamente la relación antioxidante con los radicales libres de los productos cíclicos de naturaleza redox como son el paraquat, diquat, aloxano, estreptozotocina y doxorubicina. También se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida. Por último, no se puede olvidar agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el choque térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres. (Jones *et al.*, 2000). Existen algunas circunstancias en que también se producen radicales libres como son:

- Dieta hipercalórica.

- Dieta insuficiente y/o excedente en antioxidantes.
- Procesos inflamatorios y traumatismos.
- Fenómenos de isquemia

1.2.4 Efecto nocivo de los radicales libres

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

Lípidos. Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal. Sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno (Fraga, 1990; Cadenas, 1997;). Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador.
- Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- La tensión de oxígeno.
- La presencia de hierro.
- El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión).
- La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx).

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Rangon, 1993).

Proteínas. Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.

Ácido desoxirribonucleico (ADN). Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación y/o progresión de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN. (Wiseman y Halliwell, 1996)

1.3 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son alimentos o componentes alimenticios que proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica. Los alimentos funcionales proveen nutrientes esenciales para mantenerse, crecer y desarrollarse, además proveen otros componentes biológicamente activos que tienen un impacto beneficioso para la salud o presentan efectos fisiológicamente deseables (Clydesdale, 2004). Berner y O`donnell en 1998 sugieren una clasificación de acuerdo a la función que realizan los alimentos para convertirlos en funcionales (ya sea añadiendo algún ingrediente extra y/o realizando algún proceso tecnológico específico como los siguientes

- Adición de fitoquímicos
- Adición de probióticos
- Adición de prebióticos
- Adición de péptidos o proteínas bioactivas
- Adición de fibra dietaria
- Adición de ácidos grasos Omega 3

Ciertos alimentos presentan una gran diversidad de funciones especiales. Algunas de estas funciones pueden dar origen a la reducción del riesgo o a la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades degenerativas, la mejoría de algunas funciones corporales y a su utilización como suplemento para dietas especiales (Silva *et al.*, 2003)

1.4 Papa *Solanum phureja*

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophita,
- Clase: Magnoliapsida,
- Subclase: Asteridae,
- Orden: Solanales,
- Familia: Solanaceae
- Género: Solanum
- Especie: *Solanum phureja*

Solanum phureja es una especie herbácea, diploide, tuberosa. Se cultiva en los valles montañosos de América del Sur. Se distingue claramente de las restantes especies de papas cultivadas debido a que no presenta *dormición de los tubérculos* (es decir, el tubérculo inicia inmediatamente su brotación luego de formado, sin que medie un período de reposo o dormición). Esta característica permite que las variedades de *S. phureja* puedan ser replantadas inmediatamente en aquellas zonas de climas benignos en las cuales es posible el cultivo continuo a lo largo de todo el año. La especie de papa "criolla, amarilla o yema de huevo" (*Solanum phureja*), tiene como región de origen la cordillera de los Andes, entre Perú/Ecuador, Nariño y la meseta cundi-boyacense de Colombia, a 2500 y 3000 metros de altitud, respectivamente (Espinal *et al.*, 2005)

La papa es un alimento importante dentro de la canasta familiar, esto permitió que el cultivo de la papa en Colombia ocupara el tercer lugar en la producción agropecuaria nacional con 2.72 millones de toneladas en el año 2006, el décimo cultivo en extensión con 162.000 ha, y el sexto lugar en valor de la producción según reportó el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) en 2007. En términos constantes, durante el lapso 1990-2000, creció a una tasa del 1.6%, cifra superior a la registrada por el conjunto de la agricultura sin café (1.3%) (MADR, 1999). Del 2005 al 2006 se presentó un aumento del 7% en el área cultivada y se esperaba que para el primer semestre del 2007 se produjera un aumento del 1.2% (MADR, 2007). Su participación en el valor real de la producción agropecuaria nacional, representó el 3.9%, el 4.3% del área cultivada y el 13.2% del volumen. La papa tiene un valor biológico alto en términos de su energía y proteína comparado con algunos

de los cultivos más importantes, como son el arroz, el maíz y el frijol. Se considera como uno de los alimentos más saludables por su contenido de almidones (NFS, 2002).

Se han realizado en los últimos años aportes importantes en estudio de la bioactividad de papa. En un estudio realizado (Pihlanto *et al.*, 2008) en el aumento de la hidrólisis en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), se evaluó el potencial de antioxidante a partir de la evaluación de radicales libres tomando proteínas aisladas de papa en diferentes estados fisiológicos, además de actividad inhibitoria de las hidrolasas ($IC_{50} = 0.018 - 0.086$ mg/ml), obteniendo como resultado que la papa es una fuente promisoría para la producción de compuestos bioactivos como ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales con un impacto benéfico para la salud cardiovascular.

Otro estudio presentó los efectos de polvo liofilizado de cáscara de papa cocida cuando son incorporados a una dieta en la fase posterior a la iniciación de carcinogénesis de mama inducido químicamente en ratas (Thompson *et al.*, 2009). Se evaluó la dependencia de la dosis con la actividad anticancerígena en varios cultivos de papa y la relación entre la actividad anti cáncer con la presencia de fitoquímicos, y la capacidad antioxidante. En este estudio se concluye que las papas con color de cáscara roja con contenido de ácido clorogénico y altas cantidades de antocianinas, muestran una mayor inhibición de la carcinogénesis, presentando una reducción del 23% en la incidencia de cáncer ($p = 0,009$) y una reducción del 49% en la multiplicidad de cáncer (2,1 vs 4,0 cánceres por rata, $p = 0,004$) con evidencia de un efecto dosis-dependiente en la multiplicidad de esta patología.

Estudios fitoquímicos en papa *Solanum tuberosum* se han realizado en cuanto a la identificación de antocianinas (Eichhorn *et al.*, 2005), carotenoides (Burgos *et al.*, 2009a) vitamina C (Burgos *et al.*, 2009b), catecolaminas (Szopa *et al.*, 2001), ácido caféico y ácido clorogénico (Al-Weshahy *et al.*, 2009), alcaloides (chaconina y solanina) (Smith *et al.*, 2001). Otros estudios presentan la variación de la actividad antioxidante según genotipo de papa y los compuestos fenólicos (André *et al.*, 2009), y la correlación entre la actividad antioxidante y la cantidad de polifenoles (Lachman *et al.*, 2008; Rumbaoa *et al.*, 2009;). En otras investigaciones han evaluado la actividad antimicrobial de papa en microflora de intestino de cerdos (Jin *et al.*, 2008)

1.5 Antioxidantes para prevenir oxidación lipídica en carne de pollo

En las últimas décadas el desarrollo de la avicultura ha tenido un gran impacto en los mercados y este logro se hace sentir principalmente en lo que se refiere a la producción de pollos de engorde, mucho de este progreso debido a los avances en la nutrición animal apoyado con otros aspectos como la genética y la sanidad. Para mencionar la evolución en productividad, podemos destacar la ganancia media diaria (GMD) mayor que 50 g/día, esto significa tasa de crecimiento diario con el mínimo 20% superior al peso inicial de 40 g. La conversión alimenticia también evolucionó, disminuyendo la cantidad de alimento por unidad de ganancia de peso. En los días actuales, sin mayores dificultades se obtiene un kilogramo de peso vivo con no más de 1,9 kg de ración, esto se traduce en una eficiencia alimenticia superior al 50% (Junqueira, 2005).

La carne de pollo que se consume en todo el mundo con creciente popularidad, ya que es una excelente fuente de proteínas, tiene una relación favorable de ácidos grasos insaturados frente a los ácidos grasos saturados, y proporciona vitaminas y minerales esenciales, mientras que se encuentra entre las fuentes de carne más económicas (Hargis y Elswyk Van, 1993). A finales de los años 90's la ingesta diaria per cápita de pollo en los países de la Unión Europea fue de 18 g en Finlandia a 62 g en Chipre (DAFNE, 2010), mientras que en EE.UU. el consumo anual per cápita fue más del doble entre 1974 y 2004, de 12,4 a 26,8 kg (Buzby y Farah, 2006). Dada la prevalencia de las enfermedades relacionadas con la alimentación, tales como obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, el vínculo entre la dieta y la salud se ha vuelto relevante, y la demanda de los consumidores de productos alimenticios de calidad superior se ha incrementado. Esta necesidad dio lugar a los esfuerzos para modificar la composición lipídica de la carne de ave y los huevos, por tanto los estudios se centraron en la manipulación de los ácidos grasos específicos, como los ácidos grasos omega 3 y 6 que son ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), que están presentes en nuestra dieta como α -linolénico (ALA, C18: 3 ω 3) encontrados principalmente de los aceites vegetales y nueces, y como ácidos grasos de cadena larga (LC ω 3 AGPI) que consiste principalmente de ácido eicosapentanoico (EPA, C20: 5 ω 3) y ácido docosahexanoico (DHA, C22: 6 ω 3) principalmente en pescados y mariscos. Los AGPI ω 3 presentan una amplia gama de efectos beneficiosos sobre la salud humana, si bien pueden influir en el curso de

varias enfermedades y trastornos (Simopoulos, 1991; Shahidi y Miraliakbari, 2004; Lagarde, 2008;). Entre $\omega 3$ LC, el ácido docosahexanoico (DHA) tiene un papel único en las membranas biológicas, la corteza cerebral, los tejidos nerviosos, plaquetas de la sangre debido a su efecto sobre las arterias y es responsable del desarrollo y el funcionamiento adecuado del cerebro y la retina (Mueller y Talbert, 1988; Lagarde, 2008;). Los AGPI $\omega 3$ son nutrientes "esenciales" ya que no pueden ser sintetizados por los seres humanos. ALA se convierte en EPA y DHA en el cuerpo humano, pero el alcance de esta conversión es, en el mejor de los casos, muy limitada e ineficaz (Lagarde, 2008). Sin embargo estos son fácilmente oxidables, lo que representa un problema importante durante el procesamiento de la carne, la cocción y el almacenamiento refrigerado lo que afecta a la calidad del producto debido a la pérdida de color deseable, olor y sabor, y se acorta la vida útil (Maraschiello *et al.*, 1998).

El grado de exigencia del consumidor internacional por alimentos más seguros y la exigencia para la alteración de los procedimientos convencionales, fortalecidos por legislaciones específicas para cada país, ha forzado a la industria animal a considerar nuevos conceptos en la utilización de aditivos nutraceuticos que favorezcan la salud de los animales y humanos. La adición de antioxidantes a la dieta de aves ayuda a prevenir la destrucción oxidativa de la grasa, vitaminas liposolubles y pigmentos utilizados, mejorando el metabolismo así como el estado general de los animales además de obtener carne o huevos de mejor calidad por su contenido de ácidos grasos poliinsaturados. En Europa cerca del 70% de los sistemas de alimentación de pollo de engorde utilizan antioxidantes comerciales entre los cuales se encuentran Butil Hidroxitolueno (BHT), Mono terbutil Hidroquinona (MTBHQ), EDTA y ácido cítrico (MacGeachin *et al.*, 1992) estos antioxidantes sintéticos se han utilizado para el control de la oxidación de lípidos en la carne. Sin embargo, el uso de estos antioxidantes sintéticos está restringida en algunos países debido a sus efectos tóxicos o cancerígenos (Pokorny, 1991; Hirose *et al.*, 1998).

En vista de estos inconvenientes, se ha incrementado considerablemente el interés en el uso de antioxidantes naturales en la última década. En ensayos con pollos de engorde con estos productos se ha mostrado que son efectivos reduciendo la oxidación de los compuestos grasos de la dieta durante largos periodos de almacenamiento, así mismo de la oxidación celular de los animales reduciendo los riesgos de algunas enfermedades. En otros ensayos realizados en Estados Unidos se obtuvo que dietas balanceadas con

contenido de aditivos nutraceuticos como probióticos, prebióticos y compuestos antioxidantes producen efecto simbiótico que disminuyen la tasa de mortalidad, así mismo aumenta ganancias de peso siendo un alimento más eficiente; en este ensayo también se ve que existen efectos positivos sobre la digestibilidad de la materia seca y la disponibilidad de la lisina y la metionina (Walter, 2004).

1.6 Caracterización in vitro de radicales libres

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen una gran capacidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos de alimentos. Se han planteado una serie de condiciones que debería reunir un procedimiento estandarizado de medida de capacidad antioxidante *in vitro* (Frankel y Meyer, 2000; Prior, Wu y Schaich, 2005):

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomo de hidrógeno.
- Especificar el sustrato de oxidación.
- Medir reacciones químicas que de hecho ocurran en reacciones potenciales, es decir, asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo.
- Ser sencillo.
- Tener un mecanismo y un punto final definido.
- Poseer una instrumentación disponible.
- Tener una buena reproducibilidad entre días.
- Ser adaptable para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos
- Usar distintas fuentes de radicales.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.

Sin embargo, no existe ningún método en la actualidad que reúna tales características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, y no por la combinación de varios, como se hace en la actualidad. Esto se debe a que los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes y en un mismo alimento puede

haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerarlas posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en un alimento.

1.6.1 Reacciones SET (Single Electron Transfer, SET) y reacciones (Hydrogen Atom Transfer, HAT) HAT

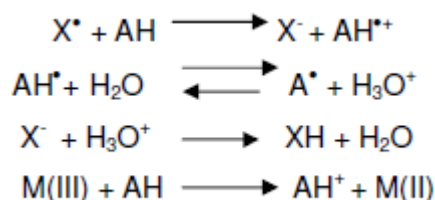
Existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes alimentarios pueden ejercer su acción, entre aquellos compuestos que reaccionan directamente con los radicales libres, como pueden ser los polifenoles, deteniendo el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain-breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET) (Prior, Wu y Schaich, 2005), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar varios métodos de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo $X\cdot$ el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo $X\cdot$ el radical libre y AH el antioxidante:



En principio, estas reacciones dependen mucho más del disolvente que las HAT. Sin embargo, se ha visto que el disolvente puede ejercer una influencia clara en el ORAC

(Oxygen Radical Absorbance Capacity) y la prueba de ABTS, a pesar de ser métodos HAT (Fernández-Pachón *et al.*, 2004; Villaño *et al.*, 2005) Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del estatus redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados. Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que la tuviera baja facilitaría la abstracción del átomo de H. Así mismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización (Siquet *et al.*, 2006). En la literatura se citan diversos métodos para medir la capacidad antioxidante mediante reacción SET tales como FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y para HAT ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

2 Composición química y Capacidad Antioxidante *in vitro* de clones de *Solanum phureja*

Los antioxidantes protegen al cuerpo humano contra los ataques de los radicales libres que pueden causar condiciones patológicas. Los daños causados por los radicales libres pueden ser mitigados a través de la suplementación con antioxidantes en la dieta. Varios compuestos con estas propiedades se encuentran en los recursos alimenticios que se consideran que tienen un alto potencial en el contexto de los enfoques terapéuticos y podrían evitar daños por parte de los radicales libres. Diversas plantas medicinales han sido examinadas y evaluadas encontrando propiedades antagónicas con los radicales libres inducidos por el estrés oxidativo (Khan *et al.*, 2010). Muchas plantas contienen cantidades importantes de estos antioxidantes como las vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides y taninos (Al-Jaber, *et al.*, 2011) que pueden ser utilizados para limpiar el exceso de radicales libres del cuerpo humano (Afolayan y Jimoh, 2008). Estos hallazgos permiten aumentar el interés de los consumidores en los productos naturales de la planta, como una fuente alternativa de barrido especies reactivas del oxígeno (ROS). Se ha planteado que los compuestos fenólicos son muy importantes debido a su origen natural y su eficiencia como estabilizadores o inactivadores. Por tanto en este estudio se analizaron clones de papa *Solanum phureja*, con el fin de evaluar sus principales compuestos antioxidantes (Ácido ascórbico, ácido clorogénico y fenoles totales) y luego determinar la capacidad antioxidante de cada uno de los clones con el fin establecer características funcionales de clones nativos del banco germoplasma Colombiano.

2.1 Metodología

2.1.1 Material vegetal

Se recolectaron 22 clones de papa *S. phureja* en el municipio de Granada-Cundinamarca, estos fueron proporcionados por el Banco Germoplasma curaduría de CORPOICA y se tomo un clon comercial de papa criolla (CO45). Los clones se encontraban sembrados con tres réplicas de campo con un diseño completamente al azar, para un total de 66 muestras.

Ubicación:

- Latitud 04°31'N Longitud 74°21'O
- Altitud: 2450 msnm
- Temperatura: 18° C
- Fecha de recolección: Febrero de 2009

Con el fin de reconocer cada uno de los clones, se le asignó un código a cada uno con las iniciales CO.

Cada una de las muestras fue lavada con agua destilada y desionizada (DD), cocida en autoclave en recipientes de polipropileno, seguidamente se llevaron a temperatura ambiente, luego fueron congeladas a una temperatura de -20°C. Posteriormente, se liofilizaron en un equipo Hetto Drywinner modelo DW 3 a una temperatura de -40°C y una presión de 0.04 mB, con el fin de mantener las propiedades de la muestra y tener resultados cercanos a las condiciones de consumo en cuanto al contenido de compuestos.

Se analizaron compuestos químicos de importancia antioxidante en 22 clones de papa nativa con sus tres replicas establecidas en campo bajo un diseño de bloques completos al azar.

2.1.2 Descripción del color del tubérculo

El color del tubérculo se determinó a través de una guía establecida para tal fin (Gómez 2000)

Tabla 2-1: Color de la piel del tubérculo (abcd)

COLOR PREDOMINANTE	INTENSIDAD COLOR PREDOMINANTE	COLOR SECUNDARIO	DISTRIBUCION DEL COLOR SECUNDARIO
1 Blanco – Crema	1 Pálido/Claro	0 Ausente	0 Ausente
2 Amarillo	2 Intermedio	1 Blanco – Crema	1 En los ojos
3 Naranja	3 Intenso Oscuro	2 Amarillo	2 En las cejas
4 Marrón		3 Naranja	3 Alrededor de los ojos
5 Rosado		4 Marrón	4 Manchas dispersas
6 Rojo		5 Rosado	5 Como anteojos
7 Rojo – Morado		6 Rojo	6 Manchas salpicadas
8 Morado		7 Rojo- Morado	7 Pocas manchas
9 Negruzco		8 Morado	
		9 Negruzco	

Figura 2-1: Tabla de colores de la piel del tubérculo de papa.

2.1.3 Caracterización Química

Se analizaron compuestos químicos de importancia antioxidante en las 66 muestras correspondientes a los 22 clones de papa *S. phureja* con tres réplicas de campo.

2.1.3.1 Determinación del contenido de Ácido Clorogénico

El protocolo utilizado para la cuantificación de ácido clorogénico fue validado en esta investigación para muestras de papa en el Laboratorio de Nutrición del Centro de Bioindustria y Biotecnología de CORPOICA. Se evaluó con base en la metodología propuesta por Ariza-Nieto. (Ariza-Nieto *et al.*, 2008). Consta de dos fases: extracción y cuantificación.

Extracción: Se tomó liofilizado de papa y se extrajo en una solución de MeOH: H₂O: Ácido Acético glacial en proporciones 1:1:1, se agitó por una hora en la oscuridad, fue centrifugado y el sobrenadante se filtró.

Cuantificación: Se realizó la curva de calibración con el estándar de ácido clorogénico en un rango de concentración de 1 a 100 μ M. Las muestras fueron leídas en un sistema UPLC (Ultraperformance Liquid Chromatography) Marca Waters Aquity.

Las condiciones cromatográficas que se trabajaron fueron

- Velocidad de flujo: 0.425 ml/min
- Columna: Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ m, 2.1 x 100 mm
- Volumen de inyección: 0.5-2.0 μ L
- Fase móvil: Gradiente de ácido fórmico 0.1% y metanol 100% (**Tabla 2-2**)

Tabla 2-2: Gradiente de elución de la fase móvil ácido fórmico (0.1 %) y metanol al 100 % para la separación y cuantificación por UPLC de ácido clorogénico

TIEMPO (min)	ÁCIDO FORMICO (0.1%)	METANOL (100%)
0.0	95%	5%
0.2	95%	5%
5.0	50%	50%
5.75	5%	95%

6.5	5%	95%
7.0	50%	50%
9.0	95%	5%
12.0	95%	5%

2.1.3.2 Determinación del contenido de Ácido Ascórbico (vitamina C)

El protocolo utilizado para la cuantificación de vitamina C fue validado en esta investigación para muestras de papa en el Laboratorio de Nutrición del Centro de Bioindustria y Biotecnología de CORPOICA, se evaluó con base en la metodología propuesta por Ariza. (Ariza *et al.*, 2008). Se conforma de dos pasos, extracción y cuantificación.

Extracción: Se tomó muestra liofilizada de papa y se adiciono una solución extractante compuesta por Ácido meta fosfórico y Dithiothreitol (DTT), posteriormente se agitó, se centrifugó y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación.

Cuantificación: Se realizó una curva de calibración con el estándar de L-Ácido Ascórbico en un rango de concentración de 1 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras fueron leídas en un sistema UPLC (Ultraperformance Liquid Chromatography) Marca Waters Aquity

Las condiciones cromatográficas a trabajar fueron

- Velocidad de flujo: 0.525 ml/min
- Columna: Acquity UPLC HSS T3 1.8 μm , 2.1 x 100 mm
- Volumen de inyección: 0.5-1.0 μL
- Fase móvil: Gradiente de ácido fórmico 0.1% y Metanol 100% (**Tabla 2-3**)

Tabla 2-3: Gradiente de elución de la fase móvil ácido fórmico (0.1 %) y metanol al 100 % para la separación y cuantificación por UPLC de vitamina C

TIEMPO (min)	ÁCIDO FORMICO (0.1%)	METANOL (100%)
0.0	100%	0%
3.0	100%	0%
4.3	80%	20%
5.3	80%	20%
5.5	100%	0%
6.2	100%	0%

2.1.3.3 Determinación del contenido de fenoles totales

El protocolo utilizado para la cuantificación de fenoles totales fue validado en esta investigación en papa en el Laboratorio de Nutrición del Centro de Bioindustria y Biotecnología de CORPOICA, se evaluó con base en la metodología propuesta por Andre. (Andre *et al.* 2007) con algunas modificaciones. Se conformó de dos pasos, extracción y cuantificación

Extracción: Se tomaron 50 mg de material liofilizado y se mezcló con 1 ml de 80% (v / v) de metanol en un microtubo graduado de centrífuga de 2ml. Esta mezcla se homogenizó y se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente. Después se centrifugaron las muestras, el sobrenadante se colectó y fue evaporado hasta sequedad en una centrífuga con vacío. Los compuestos fenólicos se resuspendieron en 1 ml de agua y se almacenaron a -20 ° C hasta su análisis.

Cuantificación: Se calculó utilizando el ensayo de Folin-Ciocalteu (Andre *et al.*, 2007). Se tomaron 500 µL de las muestras convenientemente diluidas, 1250 µL de una solución de carbonato de sodio al 7,5%, y 250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N, Se mezclaron en un microtubo de centrífuga eppendorf de 2 ml y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 755 nm utilizando un espectrofluorómetro de placas Sinergy HT. El Contenido de fenoles totales se expresó en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de material vegetal seco, a partir de una curva de concentración de ácido gálico estándar que se realizó de 0 a 300 µg/ml.

2.1.3.4 Determinación de Carotenoides totales e individuales

Este análisis fue realizado por el Centro Internacional de la papa CIP. Debido a inconvenientes de envío hacia Perú, se utilizó solo una replica por clon de papa. Se tomó como base la metodología de Kimura (Kimura *et al.*, 2007), la cual expone dos pasos extracción y cuantificación:

Extracción: Se tomó material liofilizado y se extrajo con una solución de acetona en un homogeneizador, la extracción se repitió hasta que el residuo careció de color. Los extractos fueron disueltos en éter de petróleo y saponificados con metanol y KOH. Los carotenoides saponificados fueron recuperados con éter dietílico y acetona. Para el análisis

de carotenoides individuales el extracto fue secado con gas nitrógeno (N_2), y se resuspendió en acetona grado HPLC, posteriormente se filtró para su análisis. Cuantificación: La concentración de carotenoides totales se calculó utilizando el valor de la absorbancia medida en un espectrofotómetro UV 160A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) a 450 nm y el coeficiente de extinción para las mezclas de carotenoides (2500) (Davies, 1976). Para el análisis de carotenoides individuales 10 μ l del extracto filtrado fueron inyectados en un sistema HPLC (Waters Corp., Milford, EE.UU.) Los Carotenoides totales e individuales se obtuvieron como microgramos (μ g) por cada 100 g de material vegetal seco de la muestra.

Las condiciones cromatográficas fueron:

- Velocidad de flujo: 0.8 ml/min
- Columna: YMC C30 polimérico (3 mm, 4,6 mm 250 mm)
- Volumen de inyección: 10 μ L
- Fase móvil: metil-tertbutil éter

2.1.4 Capacidad Antioxidante *in vitro*

Se realizó una primera evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* mediante las pruebas validadas para papa en esta investigación como FRAP, ABTS, DPPH y ORAC en todos los clones. Posteriormente se escogieron 10 clones para realizar las pruebas de captación de radicales específicos (superóxido, hidroxilo y peroxilo) con metodologías previamente estandarizadas en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Mora y Ospina, 2009)

2.1.4.1 FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*)

Se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido (Benzie & Strain, 1996). Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos (Pulido *et al*, 2000), ya que a los 4 minutos muchos compuestos todavía no habían acabado de reaccionar

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: Buffer Acetato a pH a 3.6.
- Solución B: HCl 1% en Metanol
- Solución C:HCl 40mM
- Solución D: TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) en HCl 40mM
- Solución E: FeCl₃ 20mM
- Solución de trabajo: Mezclar 25 ml de Buffer acetato (pH 3.6), 2.5ml de solución TPTZ y 2.5 ml de solución FeCl₃.
- Curva de calibración: Solución de trolox o ácido ascórbico en concentraciones de 10 a 300 ug/ml

Preparación de la muestra

Pesar 100+/-2 mg de muestra liofilizada
Mezclar con 2 ml de solución B
Homogenizar en agitador en oscuridad toda la noche
Centrifugar a 13000 rpm por 15 min

Lectura

Incubar la solución de trabajo 37°C
Tomar 290 µL de la solución de trabajo
Adicionar 50 µL de la muestra o estándar
Hacer mediciones cada minuto durante 30 min a 593 nm

Los valores son expresados en mg trolox/g muestra seca

2.1.4.2 ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Se trata de una reacción SET, basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS•+ (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico), captura que produce un descenso en la absorbancia a 658 nm. El descenso producido por el Trolox es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando en el mismo tiempo (Miller et al., 1993).

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: HCl 1% en metanol
- Solución B: ABTS 7mM
- Solución Persulfato de potasio K₂S₂O₈ 2.45mM:
- Solución C: FeCl₃ 20mM
- Solución de trabajo ABTS: Se mezclan en volúmenes iguales la solución de ABTS y persulfato de potasio, se deja estabilizando la reacción toda la noche (16 h

aproximadamente) a 4°C en oscuridad. Esta solución puede conservarse durante un mes en estas condiciones. Ajustar la absorbancia de la solución a 0,7 antes de su uso.

- Curva de calibración de Trolox 5 a 100 µg/ml

Preparación de la muestra

Pesar 100+/-2 mg de muestra liofilizada
Mezclar con 2 ml de solución A
Homogenizar en agitador toda la noche en oscuridad
Centrifugar a 13000 rpm por 15 min

Lectura

Tomar 290 µL de la solución de trabajo ABTS
Adicionar 50 µL de la muestra o estándar
Hacer mediciones cada minuto durante 1 hora a 734 nm

Los datos son expresados en µmol de Trolox/g muestra

2.1.4.3 DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

En este método se sitúa el DPPH•, un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm

(Brand-Williams *et al.*, 1995). El mecanismo de reacción de este método no está aun totalmente claro. Se pensaba que era un mecanismo simultáneamente SET y HAT. Sin embargo, un trabajo ha sugerido que el mecanismo fundamental es SET, y que la reacción de tipo HAT tendría una escasa contribución, dado que se produce lentamente en disolventes que son fuertes aceptadores de H, como el metanol o el etanol (Foti *et al.*, 2004).

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: HCl 1% en metanol
- Solución B: DPPH 20 mg/L.
- Curva de calibración de Trolox 10 a 100 µg/ml

Preparación de la muestra

Pesar 100+/-2 mg de muestra liofilizada
Mezclar con 2 ml de solución B
Homogenizar agitador toda la noche en oscuridad
Centrifugar a 13000 rpm por 15 min

Lectura

Tomar 280 μ L de la solución de trabajo DPPH
Adicionar 50 μ L de la muestra o estándar
Hacer mediciones cada minuto durante 1 hora a 515 nm

Los datos son expresados en μ mol de Trolox/g muestra

2.1.4.4 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Se trata de un mecanismo HAT. Mide la capacidad de captación de un radical específico, el peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica AAPH, que se trata de un iniciador de tipo azo. Estos radicales atacan a la molécula de fluoresceína, produciendo fluoresceína oxidada, que ya no emite fluorescencia (longitud de onda de excitación 493 nm. y de emisión 515 nm.) En presencia de antioxidantes, éstos reaccionan con los radicales peroxilo y la fluoresceína mantendrá la misma emisión de fluorescencia. Por tanto, se lleva a cabo una comparación entre el descenso en la fluorescencia producido en presencia y en ausencia de un antioxidante (Ou et al., 2001)

Se prepararon las siguientes soluciones

- Solución A: HCl 1% en metanol
- Solución B: Buffer fosfato Salino (PBS) 7.5 mM pH 7.4
- Solución C: Solución de Fluoresceína 55nM
- Solución D: AAPH 153 nM
- Curva de calibración de Trolox 5 a 40 μ M

Preparación de la muestra

Pesar 10-20 mg de muestra liofilizada
Mezclar con 35 ml de solución A
Homogenizar en agitador en oscuridad toda la noche
Centrifugar a 4000 rpm por 15 min

Lectura

Tomar 250 μ L de la solución C
Adicionar 25 μ L de la muestra o estándar
Incubar por 30 min a 37°C

Adicionar 25 μ L de solución D
Hacer mediciones cada minuto por 1 hora a una longitud de onda de excitación 485 nm y emisión 520 nm

Los resultados se calcularon usando las diferencias de áreas bajo la curva entre el blanco y la muestra y se expresaron como μ mol equivalentes de Trolox/g muestra.

La actividad que reportan estas pruebas con radicales sintéticos es importante pero para complementar la información acerca de la actividad captadora de radicales libres por parte de la papa se llevaron a cabo ensayos de generación de radicales propios de un sistema vivo para evaluar la actividad de estos clones sobre la generación de estos tales como hidroxilo, peroxilo y superóxido. Para esto fue necesario realizar un análisis de puntuación ó scoring, donde se le daba un puntaje a cada variable: 0,1 como el más bajo puntaje y 0,5 al más alto y se establecieron rangos de concentraciones altas, medias y bajas.

2.1.4.5 Captación del Radical Peroxilo ($ROO\cdot$) Sistema: ABAP/LISOZIMA

Se empleó el método ABAP/Lisozima, en el cual, la descomposición térmica del "azo-iniciador" soluble en agua 2,2'-azobis(2-metilpropion-amidina) diclorhidrato (ABAP) produce radicales centrados en el átomo de carbono, los cuales en presencia de oxígeno generan radicales peroxilo a una velocidad controlada. Los radicales peroxilo inhiben la enzima lisozima presente en el medio y dependiendo del daño ocasionado a ésta, se establece si un compuesto capturó los radicales o no. Como indicativo del daño de la enzima se evalúa su actividad lítica sobre *Micrococcus lysodeikticus* a 490 nm (Halliwell, 1991). A mayor efecto captador de radicales peroxilo, menor daño a la enzima y por lo tanto mayor lisis que se traduce en un mayor delta de absorbancia. Como inhibidor de referencia se empleó el ascorbato (Cf 100 μ M) y los extractos de papa a una Cf 100 μ g/ml. Para cada una de las muestras es empleado un blanco, donde no hay generación de radical peroxilo ya que no contiene ABAP. En él se refleja la máxima actividad de la lisozima y permite determinar por comparación frente al blanco control, si las sustancias evaluadas interfieren (aumentando o disminuyendo) la actividad lítica de la enzima.

El ensayo se desarrolló empleando las condiciones de trabajo reportadas.

Tabla 2-4: Protocolo para la determinación de la captación del radical peroxilo por las muestras de papa en el sistema ABAP / Lisozima

Reactivos	Cf	B _C	C	B _M	M
Tampón KH ₂ PO ₄ – KOH 50 mM, pH 7,4	---	100µL	---	100µL	---
Muestra y/o DMSO	100µg/mL	---	---	10µL	10µL
Lisozima	50000 U/mL	900µL	900µL	900µL	900µL
ABAP	10 mM	---	100µL	---	100µL
Mezclar agitando suavemente.					
Calentar uniformemente en baño a 45 °C durante 90 minutos.					
Enfriar y mantener en baño de hielo.					
Tomar 50 µL de la mezcla de reacción y adicionar sobre 950 µL de una suspensión de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> . (0.3 mg/mL disueltos en tampón Dulbecco)					
Medir disminución de la turbidez a 450 nm, cada 10 segundos durante 30 segundos. Oprimir la tecla RUN al adicionar la suspensión de <i>Micrococcus</i> (retardo 10 segundos)					

Los resultados son expresados en términos de porcentajes de inhibición de la lisozima, tomando como el 100% de actividad enzimática la presentada por el control

$$\% \text{Inhibición} = \frac{[(\Delta A)_{B_C} - (\Delta A)_C] - [(\Delta A)_{B_M} - (\Delta A)_M]}{[(\Delta A)_{B_C} - (\Delta A)_C]} \times 100$$

2.1.4.6 Captación del Radical Hidroxilo generado en el sistema H₂O₂/Fe³⁺/EDTA/ Ascorbato

La evaluación de la actividad captadora del radical hidroxilo se efectuó en un ensayo denominado "principal" en el que se realizaron cuatro réplicas de las muestras a evaluar en un volumen final de 1.0 ml, colocando series del control (C) y las muestras (M) (Patrón: DMSO Cf: 20 mM; extractos Cf: 100 µg/ml) con sus respectivos blancos (B). El orden de adición de los reactivos es descrito en la **Tabla 2-5**. Paralelo al ensayo "principal" se efectuó otro ensayo denominado "control" siguiendo el mismo esquema del primer ensayo pero en ausencia de ascorbato (sAsc), con el fin de detectar las posibles interferencias sobre el medio de evaluación que pueda llegar a tener las muestras.

Tabla 2-5: Protocolo para la determinación de la captación de radical hidroxilo por los clones de papa en el sistema H₂O₂/Fe³⁺/EDTA/ Ascorbato

Reactivos	Cf	B _C	C	B _M	M	B _C sAsc	C sAsc	B _M sAsc	M sAsc
Tampón fosfato	---	890 μ L	790 μ L	880 μ L	780 μ L	900 μ L	800 μ L	900 μ L	800 μ L
Muestra	100 μ g/mL	---	---	10 μ L	10 μ L	---	---	10 μ L	10 μ L
Desoxirribosa	2.8 mM	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Ascorbato	50 μ M	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	---	---	---	---
Fe ³⁺ -EDTA	20 μ M - 100 μ M	---	50 μ L	---	50 μ L	---	50 μ L	---	50 μ L
H ₂ O ₂	1.42 mM	---	50 μ L	---	50 μ L	---	50 μ L	---	50 μ L
Calentar en baño a 37°C durante 60 minutos.									
Adicionar 1 mL de TCA al 2.8% y 1 mL de TBA al 1%.									
Calentar a 92° C durante 15 minutos.									
Enfriar en baño de hielo durante 5 minutos.									
Medir absorbancia a 532 nm.									

La disolución del FeCl₃ se realizó en EDTA.Na₂.2H₂O (2 mM) y las muestras, desoxirribosa, ascorbato y H₂O₂ se realizaron en tampón fosfato KH₂PO₄-KOH 10 mM pH 7.4. El complejo Fe³⁺-EDTA, el ascorbato y el H₂O₂ se prepararon inmediatamente antes de su uso. Los resultados del ensayo "principal" se expresaron como porcentaje de captación del radical hidroxilo:

$$\% \text{ Captación} = \frac{[(\Delta A)C - (\Delta A)B_C] - [(\Delta A)M - (\Delta A)B_M]}{[(\Delta A)C - (\Delta A)B_C]} \times 100$$

2.1.4.7 Captación del anión superóxido generado por el sistema Hipoxantina/ Xantina Oxidasa

En este ensayo el radical superóxido generado por la acción de Xantina oxidasa sobre el sustrato hipoxantina (disuelta en el tampón fosfato KH₂PO₄-KOH, 50 mM, pH 7,4) produce radicales superóxido los cuales reaccionan con el NBT (Nitro Blue Tetrazolium) para formar el compuesto diformazán que posee un máximo de absorbancia de 560 nm. Los captadores del radical disminuyen la velocidad de formación del cromóforo, disminuyendo el delta de absorción producido a esta longitud de onda.

El experimento se encuentra constituido por:

- Un blanco de cada control o muestra en el que no hay generación de superóxido debido a la ausencia de la enzima xantina oxidasa

- Un control de máxima producción de radical superóxido y las muestras a una concentración final (CF)
- Patrones: n-Propilgalato 100 μM , las muestras 100 $\mu\text{g/ml}$ disueltos en el tampón fosfato

Todos los reactivos y muestras fueron preparados el día del ensayo y adicionados en el orden presentado en el protocolo, de tal forma que la enzima xantina oxidasa se adicionó inmediatamente antes de iniciar la lectura espectrofotométrica de cada muestra, para así desencadenar la reacción.

Tabla 2-6: Protocolo para determinar la actividad captadora del radical superóxido en el sistema xantina/ xantina oxidasa

Reactivos	CF	Blanco control (μL)	Control (μL)	Blanco muestra (μL)	Muestra (μL)
Muestra	-----	-----	-----	10	10
Vehículo muestra	-----	10	10	-----	-----
EDTA $\cdot\text{NA}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1mM	100	100	100	100
Hipoxantina	100 μM	10	10	10	10
NBT	100 μM	100	100	100	100
Tampón fosfato	50mM	800	700	800	700
Mezclar bien con agitación suave					
Xantina Oxidasa	0.066U/ml	-----	100	-----	100
Medir absorbancias a 560 nm, cada 20 segundos, durante 2 minutos					

Cada serie con 6 réplicas

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la reducción de NBT:

$$\%I = \frac{[(\Delta A)C - (\Delta A)B_C] - [(\Delta A)M - (\Delta A)B_M]}{[(\Delta A)C - (\Delta A)B_C]}$$

Dónde:

ΔA : Variación de la absorbancia en el tiempo

B_C : Blanco del control; C: control

B_M : Blanco de la muestra; M: Muestra

2.1.4.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente por ANOVA bajo un diseño de bloques completamente al azar, utilizando el procedimiento GLM (General Linear Models de SAS Inst. Inc., Cary, NC). Cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey para diferenciar medias con $P < 0.05$. Adicionalmente, se evaluó la correlación entre las variables analizadas.

2.2 Resultados y Discusión.

2.2.1 Descripción del color del tubérculo

De acuerdo al criterio sugerido por Gómez en el 2000 se estableció el color de cada uno de los clones utilizados en este ensayo.

Figura 2-2: Clones de papa *S. phureja* usados en este estudio



2.2.2 Caracterización Química

2.2.2.1 Determinación de ácido clorogénico, ácido ascórbico y fenoles totales

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre clones en cuanto al contenido de ácido clorogénico y ascórbico, con un rango de 174,09 a 627,48 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y 44,90 a 114,93 $\text{mg}/100\text{g}$, respectivamente (**Tabla 2-7**). En la concentración de fenoles totales se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) por efecto del clon con variación entre 238,34 y 426,96 $\text{mg EAG}/100\text{g}$ como se observa en la tabla 2-7. Se observó que el clon comercial CO45 es menor a los clones del banco germoplasma, especialmente con CO56 que presentó el contenido más alto ($p < 0,005$). Los resultados son comparables con clones estudiados por Navarre (Navarre *et al.*, 2011) donde se realizó un perfil de fenoles en diferentes genotipos de papa por HPLC, encontrando rangos de ácido clorogénico de 22 a 473 $\mu\text{g}/100\text{g BS}$. Leo en 2008 (Leo *et al.*, 2008) también hacen referencia al rango de ácido clorogénico entre 98 y 283 $\mu\text{g}/100\text{g BS}$. Burlingame en 2009 realizó (Burlingame *et al.*, 2009) un estudio de la FAO donde reportó cantidades hasta de 1570 $\mu\text{g}/100\text{g BS}$, resultados comparables a los obtenidos en este estudio.

En cuanto a ácido ascórbico, el clon comercial también se encuentra en pequeñas cantidades comparado con los demás clones ($P < 0,005$). Los resultados son comparables con Burgos en 2009 (Burgos *et al.*, 2009) presentó en su estudio del Centro Internacional de la Papa (CIP), un rango de 22,2-121,4 $\text{mg}/100\text{g BS}$ en 25 genotipos evaluados. Andre en 2007 (Andre *et al.*, 2007) evaluó una colección de 74 genotipos de papa mostrando en ácido ascórbico rangos de 217-689,47 $\mu\text{g}/\text{g BS}$, así mismo Love en 2004 (Love *et al.*, 2004) reporta en 75 genotipos evaluados un rango de 11,5-29,8 $\text{mg}/100\text{g}$, siendo estas últimas menores en concentración a los clones evaluados en esta investigación.

Tabla 2-7: Contenido de compuestos con propiedades antioxidantes en clones de papa *Solanum phureja*

Clon	Ácido clorogénico ($\mu\text{g}/100\text{gBS}$)	Ácido ascórbico ($\text{mg}/100\text{g BS}$)	Fenoles totales ($\text{mg EAG}/100\text{gBS}$)	Color de la cáscara
CO33	627,48 \pm 96,58 a	92,88 \pm 6,10 abcd	340,031 \pm 26,52 abc	Naranja
CO34	326,49 \pm 50,65 bcd	70,49 \pm 7,73 abcd	313,41 \pm 18,56 abc	Negrusco
CO36	232,30 \pm 14,92 cd	62,08 \pm 6,02 abcd	237,64 \pm 15,51 c	Naranja
CO37	255,26 \pm 25,23 cd	68,14 \pm 2,28 abcd	306,98 \pm 12,21 abc	Naranja
CO38	174,09 \pm 24,52 d	83,87 \pm 14,19 abcd	253,23 \pm 17,81 bc	Naranja
CO40	240,79 \pm 63,72 cd	44,89 \pm 4,50 d	288,84 \pm 43,36 abc	Naranja
CO41	215,40 \pm 13,52 cd	78,56 \pm 18,7 abcd	238,33 \pm 12,03 c	Naranja
CO45	189,30 \pm 14,2 d	46,56 \pm 6,28 cd	256,30 \pm 5,54 bc	Naranja

CO55	382,20 ± 45,53 abcd	86,61 ± 12,03 abcd	309,53 ± 30,33 abc	Negruzco
CO56	416,34 ± 66,44 abcd	86,41 ± 3,68 abcd	426,96 ± 5,33 a	Morado
CO57	542,03 ± ab	104,69 ± abc	392,30 ± 42,8 ab	Rojo
CO58	258,82 ± 11,45 cd	100,95 ± 3,25 abcd	286,61 ± 16,59 abc	Naranja
CO59	548,73 ± 88,21 ab	88,90 ± 7,47 abcd	322,48 ± 40,02 abc	Morado
CO60	542,28 ± 55,59 ab	94,96 ± 6,70 abcd	308,32 ± 10,37 abc	Morado
CO61	309,27 ± 46,35 bcd	112,73 ± 11,48 ab	330,16 ± 35,69 abc	Rojo
CO62	372,37 ± 19,96 abcd	89,75 ± 9,59 abcd	337,64 ± 26,36 abc	Rojo
CO63	445,43 ± 82,79 abc	114,92 ± 9,69 a	291,67 ± 17,99 abc	Rojo
CO64	267,62 ± 10,34 cd	67,59 ± 11,28 abcd	272,09 ± 12,02 bc	Naranja
CO65	258,34 ± 12,47 cd	56,11 ± 7,79 bcd	265,84 ± 8,63 bc	Naranja
CO66	624,11 ± 48,20 a	105,64 ± 19,84 ab	244,61 ± 21,89 bc	Rojo
CO67	229,83 ± 5,64 cd	54,24 ± 2,96 bcd	292,33 ± 42,13 abc	Naranja
CO68	501,42 ± 89,79 ab	101,67 ± 5,69 abcd	326,32 ± 51,90 abc	Rojo

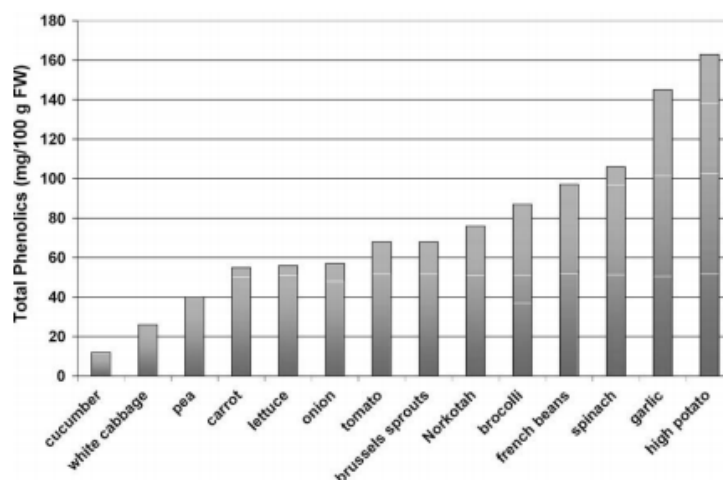
BS: Base seca; EAG: Equivalentes de Ácido Gálico. Los datos se presentan como la media de las observaciones ± Error Estándar. Valores promedios de cada fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre clones ($P < 0,05$)

En el contenido de fenoles totales, Andre en 2007 (Andre *et al.*, 2007) y Navarre en 2011 (Navarre *et al.*, 2011), encontraron rangos de 149- 443 mg EAG/100g y 200 a 110 mg EAG/100g respectivamente. Si comparamos los clones de alta cantidad de fenoles a algunos informes publicados de la cantidad de fenoles totales que se encuentran en otros alimentos como tomates, guisantes, cebollas, pepino, repollo, zanahorias y lechugas, las papas muestran mejores contenidos (Figura 2-3). Además, las cifras de los genotipos de papa referenciados en esta publicación están por encima en un 50 y 70% con respecto a los otros alimentos estudiados (brócoli, coles de Bruselas, y espinacas). Por lo tanto, la papa es una fuente importante de compuestos fenólicos en la dieta y se compara favorablemente con verduras.

Un estudio evaluó la contribución de 34 frutas y verduras a la ingesta de fenólicos en la dieta estadounidense y concluyó que las papas fueron la tercera fuente más importante después de las manzanas y las naranjas (Chun *et al.*, 2005). La variación en el contenido fenólico de la papa es un excelente ejemplo de la posibilidad de aumentar aún más el consumo de estas fuentes importantes de compuestos por su valor nutricional. Los resultados obtenidos en cuanto al contenido de estos compuestos postulan a estos clones

colombianos como promisorios por su valor en compuestos antioxidantes y aporte a la nutrición, además este estudio es pionero en clones del banco Germoplasma de Colombia.

Figura 2-3: Contenido de fenoles totales en 14 alimentos (Navarre *et al.*, 2011)



2.2.2.2 Determinación de carotenoides totales e individuales

En este estudio se evaluó el contenido de carotenoides con el respaldo del CIP, pero no fue posible realizar una prueba estadística ya que solo se tenía una réplica de campo para cada clon, sin embargo la información obtenida es importante para mostrar contenidos con respecto a otros estudios en papa. Como se observa en la tabla 2-8, los valores obtenidos para carotenoides totales estuvieron en rango de 194,32 a 1828,34 $\mu\text{g}/100\text{g BS}$.

Tabla 2-8: Contenido de carotenoides totales e individuales en clones de papa

Clon	$\mu\text{g}/100\text{g BS}$			
	Carotenoides totales	Zeaxantina	Luteína	β Caroteno
CO33	546,67	70,97	83,82	
CO34	222,91	14,76	55,72	16,69
CO36	682,86	58,94	94,74	ND
CO37	1370,00	553,67	ND	ND
CO38	1234,32	545,23	ND	ND
CO40	1828,34	760,99	ND	ND
CO41	1353,99	617,70	ND	ND
CO45	1134,48	535,49	ND	ND

CO55	311,17	27,31	75,45	21,91
CO56	421,86	76,42	35,14	6,24
CO57	319,01	44,80	51,91	7,72
CO58	832,46	409,30	ND	ND
CO59	194,32	1,37	69,15	12,50
CO60	228,75	10,57	74,73	10,46
CO61	652,11	118,55	68,26	ND
CO62	579,41	95,79	48,78	ND
CO63	731,55	154,93	88,10	ND
CO64	1065,90	388,54	ND	ND
CO65	1223,61	544,23	ND	ND
CO66	968,77	174,42	111,44	ND
CO67	1301,64	516,77	ND	ND
CO68	710,30	131,20	94,77	ND

ND= no disponible

También se analizaron los carotenoides individuales como zeaxantina con valores de 1,37-760,99 $\mu\text{g}/100\text{g}$ BS, luteína entre 35,14 y 111,44 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y β caroteno con rangos que van desde 6,24 hasta 21,91 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Tabla 2-8). Estos resultados son comparables con el estudio realizado por Bonierbale *et al* en 2009 donde evaluaron 152 accesiones del Banco Germoplasma del CIP reportando valores altos con respecto a los de este estudio ya que para carotenoides totales ellos indican 440 a 8560 $\mu\text{g}/100\text{gBS}$, Zeaxantina 0 a 6180 $\mu\text{g}/100\text{g}$, Luteína 190 a 1190 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y β caroteno 0 a 150 $\mu\text{g}/100\text{g}$, sin embargo los resultados son importantes para este primer estudio. Otros trabajos como el de Burlingame en 2009 (Burlingame *et al.*, 2009) reporta carotenoides totales de 2700 $\mu\text{g}/100\text{g}$ BS. Un estudio encontró que los cultivares de tubérculo claro tenían 27-74 $\mu\text{g}/100\text{g}$ en peso fresco de carotenoides (Iwanzik *et al.*, 1983). En Cultivos de papas diploides derivados de *S. stenotomum* y *S. phureja* se encontró que contenían hasta 2000 $\mu\text{g}/100\text{g}$ en peso fresco de zeaxantina (Brown *et al.*, 1993) lo cual está de acuerdo (al pasarlo a las mismas unidades) con el resultado de zeaxantina en esta investigación (tabla 2-8). Un estudio de 74 variedades andinas encontró concentraciones de carotenoides totales de 3 a 36 $\mu\text{g}/\text{g}$ BS (André *et al.*, 2007a). Así mismo André en 2007 (André *et al.*, 2007b) reporta que se realizó un screening de 24 cultivares andinos de genotipos identificados con cerca de 18 $\mu\text{g}/\text{g}$ BS cada uno de luteína y zeaxantina y poco más de 2 $\mu\text{g}/\text{g}$ BS de β caroteno, y un rango en sus genotipos evaluados de 2,83-6,81 $\mu\text{g}/\text{g}$ BS.

Estos últimos resultados se encuentran dentro de los rangos estimados en esta investigación, se exaltan los genotipos del Banco Germoplasma del CIP, ya que estos muestran cantidades mayores en los carotenoides individuales, sin embargo los resultados obtenidos plantean que estos clones pueden ser fuente de carotenos importantes para la salud humana ya que actualmente hay una creciente conciencia de los beneficios para la salud de los carotenoides en la dieta humana además de los carotenoides individuales con diferentes propiedades benéficas.

La luteína y la zeaxantina (hidroxicarotenoides) son los pigmentos más importantes de la región amarilla de la retina humana (Landrum y Bone, 2001) y se cree que un alto consumo de estos carotenoides pueden proteger contra la degeneración macular relacionada con la edad, que es una de las principales causas de ceguera en el envejecimiento de la población (Seddon et al., 1994). Por otro lado, ya que la vitamina A (retinol) es esencialmente la mitad de la molécula de β -caroteno con una molécula adicional de agua al final de la cadena de polieno lateral, el β -caroteno se constituye como una buena fuente para la formación de esta vitamina (Rodríguez-Amaya, 2001).

2.2.2.3 Relación del color de la cáscara de papa con el contenido de compuestos

Se evidenció la relación del color de la cáscara de la papa con el contenido de ácido clorogénico y ascórbico. La concentración de ácido clorogénico fue significativamente más alto ($p < 0,001$) en papas de cáscara de color morado (509,91 $\mu\text{g}/100\text{g BS}$) respecto a las demás. El contenido de ácido ascórbico de papas con cáscara rojo y morado (100,42 y 91,93 $\text{mg}/100\text{g BS}$, respectivamente) fue mayor ($p < 0,001$) al obtenido en papas con cáscara naranja (69,41 $\text{mg}/100\text{g BS}$) y similar al de papas con cáscara negruzca (78.55 $\text{mg}/100\text{g BS}$) (Figuras 2-4 y 2-5).

Con respecto a la concentración de fenoles totales no se presentaron diferencias significativas por efecto del color de la cáscara. Sin embargo, se evidencia mayor cantidad en papas de color rojo (331,36 $\text{mg EAG}/100$). Se establecieron correlaciones significativas ($p < 0,001$) entre ácido clorogénico y ácido ascórbico con un coeficiente de correlación de 0.49 así como entre fenoles totales y ácido clorogénico con coeficiente de 0.40 ($P < 0,01$). El color de la cáscara mostró una relación directa con el contenido de ácido clorogénico, ascórbico y fenoles con coeficientes de correlación de 0,59 $P < 0,0001$; 0,42 $P < 0,001$ y 0,37 $P < 0,05$. Es así como se evidencia en este estudio una marcada relación del color de la

cáscara de la papa, y el contenido de compuestos antioxidantes, posiblemente debido al contenido de antocianinas. En otros estudios donde se ha analizado otras especies de *S. phureja* se han encontrado resultados similares en cuanto al contenido ácido clorogénico y la presencia de altos contenidos de fenoles en papas de color morado y rojo (Navarre *et al.*, 2011).

Figura 2-4: Relación entre el color de la cáscara y el contenido de Ácido Clorogénico en los clones de papa *S. phureja*

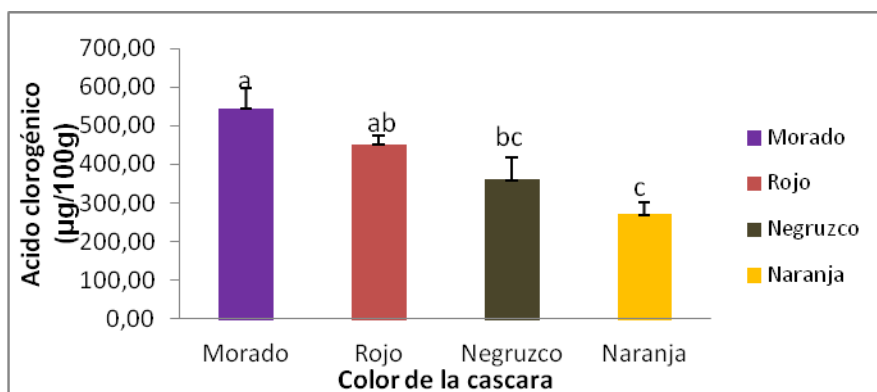
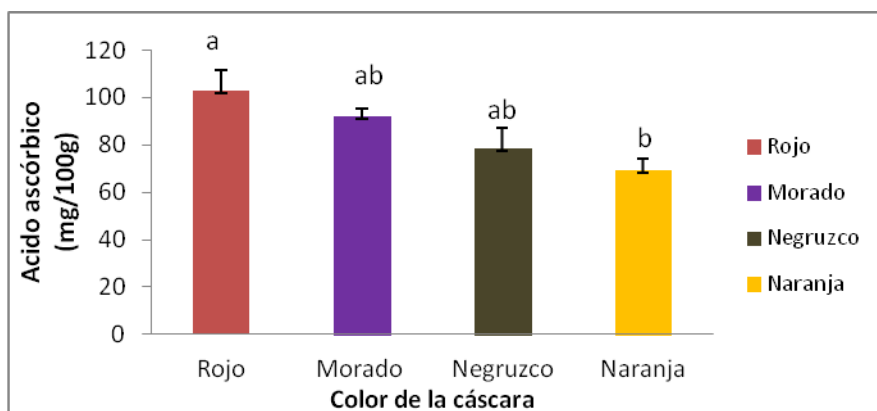


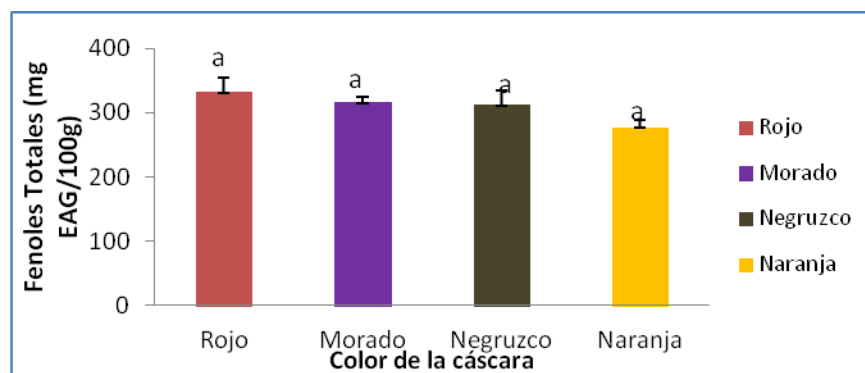
Figura 2-5: Relación entre el color de la cáscara y el contenido de Ácido Ascórbico en los clones de papa *S. phureja*



Los resultados del presente estudio presentados en la figura 2-6 son comparables con los reportados por Navarre *et al.* 2011, ya que ellos hacen el análisis de compuestos fenólicos totales y ácido clorogénico en 50 genotipos de papa y encuentran que los genotipos coloreados contienen principalmente más fenoles que los de color más claro (Navarre *et al.*, 2011). En otro estudio realizado por Leri en 2011 (Leri *et al.*, 2011), se establece la relación

que hay entre el contenido de fenoles y el color de la cáscara y pulpa de las papas analizadas, se plantea que los tubérculos con pulpa de alto contenido de pigmentos presentan el contenido más alto de ácidos fenólicos. En cuanto a la cáscara, el contenido de fenoles se le atribuye a las antocianinas, con valores que van desde 620 hasta 2450 mg/kg. La pulpa de la variedad francesa con color violeta oscuro y la variedad italiana con color rojo mostraron un contenido de ácidos fenólicos totales de 837 a 88,8 mg/kg y 204 a 196 mg/kg, respectivamente.

Figura 2-6: Relación entre el color de la cáscara y el contenido de fenoles totales en los clones de papa *S. phureja*



Al-Weshah en 2009 (Al-Weshah *et al.*, 2009) estableció en un estudio, que los genotipos de piel roja tenían mayor cantidad de ácido clorogénico que las de piel amarilla o genotipo gold, con valores de 219-279 mg/g BS. Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación con los clones de papa.

El color de la pulpa amarillo/naranja que se encuentra en algunas papas se debe a los carotenoides (Brown *et al.*, 1993). La coloración anaranjada en las papas se debe a la zeaxantina mientras que la concentración de luteína se correlaciona bien con la intensidad de la coloración amarilla. Cuando la pulpa es casi blanca las papas suelen contener menos carotenoides de los cultivares de color amarillo o naranja (Brown *et al.*, 1993).

Los materiales de papa estudiados presentan altos contenidos de ácido clorogénico, siendo este ácido fenólico uno de los más representativos de acuerdo a estudios de capacidad antioxidante (Navarre *et al.*, 2011), así mismo la relación con el color sustenta la presencia de compuestos fenólicos que pueden ser de interés en la capacidad antioxidante.

2.2.3 Capacidad Antioxidante *in vitro*

2.2.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante FRAP, ABTS, DPPH y ORAC

Luego de determinar el contenido de compuestos se procedió evaluar la capacidad antioxidante de los clones y así destacar su funcionalidad.

Se encontraron diferencias significativas en cuanto a FRAP en los clones CO38, CO45, CO55 y CO56 ($P < 0.0145$), destacándose el clon CO56 por su alto contenido frente al clon comercial CO45, en DPPH ($P < 0.002$) en los clones CO40 y CO66, en ABTS se destaca nuevamente el clon56 por su alta capacidad antioxidante frente a la muestra comercial CO45 ($P < 0.002$), sin embargo en ORAC no se encantaron diferencias significativas. Así mismo se establecieron correlaciones entre el componente químico de los clones y la capacidad antioxidante (Tabla 2-9).

Tabla 2-9: Capacidad antioxidante de clones de papa

Clon	FRAP mg ET/100g BS	ABTS ug ET /g BS	DPPH ug ET/g BS	ORAC umol ET/g BS
CO33	142,34 \pm 33,57 ab	88,24 \pm 12,35 ab	112,78 \pm 11,85 abc	44,07 \pm 1,86 a
CO34	163,84 \pm 16,37 ab	81,80 \pm 5,12 ab	112,68 \pm 18,46 abc	35,47 \pm 4,46 a
CO36	125,14 \pm 18,15 ab	78,33 \pm 5,87 ab	86,24 \pm 27,93 abc	36,06 \pm 4,82 a
CO37	138,31 \pm 13,89 ab	80,47 \pm 7,69 ab	114,24 \pm 10,09 abc	31,05 \pm 2,11 a
CO38	75,14 \pm 18,90 b	74,43 \pm 2,35 ab	43,76 \pm 5,21 bc	28,98 \pm 3,50 a
CO40	137,05 \pm 32,53 ab	84,18 \pm 9,12 ab	198,17 \pm 12,67 a	21,67 \pm 4,13 a
CO41	155,66 \pm 41,17 ab	93,65 \pm 18,81 ab	163,49 \pm 15,22 ab	34,79 \pm 1,25 a
CO45	111,96 \pm 12,18 b	85,66 \pm 3,22 ab	112,00 \pm 9,13 abc	24,86 \pm 1,07 a
CO55	99,87 \pm 2,45 b	70,54 \pm 9,19 b	130,26 \pm 16,92 abc	32,30 \pm 3,53 a
CO56	198,14 \pm 3,87 a	101,58 \pm 3,49 a	178,50 \pm 10,58 ab	39,54 \pm 5,27 a
CO57	150,01 \pm 27,93 ab	88,22 \pm 2,62 ab	175,50 \pm 12,44 ab	37,79 \pm 3,73 a
CO58	120,69 \pm 12,93 ab	80,97 \pm 10,53 ab	140,24 \pm 24,26 abc	33,61 \pm 6,14 a
CO59	134,79 \pm 7,76 ab	79,69 \pm 8,27 ab	90,60 \pm 15,66 abc	50,09 \pm 1,51 a
CO60	150,21 \pm 9,28 ab	82,71 \pm 2,10 ab	148,21 \pm 19,17 abc	47,48 \pm 2,04 a
CO61	131,42 \pm 29,46 ab	87,44 \pm 15,84 ab	91,54 \pm 17,01 abc	35,65 \pm 5,25 a
CO62	184,52 \pm 35,15 ab	97,57 \pm 13,07 ab	146,10 \pm 14,94 abc	35,73 \pm 3,97 a
CO63	154,79 \pm 26,84 ab	93,57 \pm 2,21 ab	53,18 \pm 18,35 bc	40,22 \pm 7,32 a
CO64	165,19 \pm 20,76 ab	85,57 \pm 10,37 ab	179,28 \pm 8,27 ab	46,90 \pm 6,11 a
CO65	128,19 \pm 23,23 ab	79,00 \pm 9,06 ab	168,72 \pm 22,51 ab	27,23 \pm 2,58 a

CO66	163,21 ±30,53 ab	99,45 ±10,49 ab	21,14 ±3,19 c	42,81 ±6,44 a
CO67	125,23 ±28,09 ab	73,93 ±11,58 ab	170,27 ±10,20 ab	28,72 ±5,98 a
CO68	142,01 ±36,89 ab	76,79 ±16,39 ab	79,87 ±19,13 abc	53,06 ±6,00 a

BS: Base seca; ET: Equivalentes Trolox. Los datos se presentan como la media de las observaciones ± Error Estándar. Valores promedios de cada fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre clones ($P < 0,05$).

Numerosos artículos publican una alta capacidad antioxidante de los tubérculos de papa (Sosulski *et al.*, 1982; Mattila y Hellström, 2007; Lachman *et al.*, 2008) donde se exponen correlaciones entre la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y el color del tubérculo. Rodríguez de Sotillo (Rodríguez De Sotillo *et al.*, 1994) y Singh (Singh y Rajini, 2004) también midieron las propiedades antioxidantes en muestras de cáscara de papa, obteniendo que la cantidad de fenoles encontrados en la cáscara usada en sus experimentos y la actividad frente al radical DPPH dependían directamente, esto se puede atribuir a su capacidad de donar hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose en una molécula radicalaria relativamente estable (Heim *et al.*, 2002). Autores anteriores (Tanaka *et al.*, 1988; Pin-Der *et al.*, 1999; Pin-Der, 1998) han observado una correlación directa entre la actividad antioxidante y el poder reductor de ciertos extractos de plantas con el contenido de compuestos fenólicos. Las propiedades de la reducción se asocian generalmente con la presencia de reductores como el ácido ascórbico (Pin-Der, 1998), y ha demostrado ejercer una acción antioxidante al romper la cadena de los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno (Gordon, 1990).

Al-Weshahy en 2009, (Al-Weshahy *et al.*, 2009) mostró que en genotipos de papa de color rojo la capacidad antioxidante medida a través de ABTS estaban en un rango de 0,28 a 0,55 mM ET/g, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio (Figura 2-8).

En un estudio que se realizó en papas bolivianas denominadas chuños (Peñarrieta *et al.*, 2011) se llevó a cabo el ensayo de ABTS resultando rangos de 0,4-2,7 $\mu\text{mol ET/g}$, que son similares al compararlos con los del presente estudio (Tabla 2-8), sin embargo los resultados reportados por Xu en 2009 (Xu *et al.*, 2009) que presentan actividad ABTS de 6800-11000 $\mu\text{mol ET/g}$ en extractos de metanol-agua, son más altos por el medio de extracción. La actividad de los antioxidantes hidrofílicos puede ser en gran parte

relacionada con el contenido de fenoles solubles en agua presentes en los extractos de papa.

En este mismo estudio (Xu *et al.*, 2009) la actividad antioxidante DPPH de cáscara de papa en cuatro genotipos presentó un rango de 0,14 a 2,26 mg ET/g de papa. Así mismo se reportan resultados de Nara en 2006 (Nara *et al.*, 2006) donde se presenta una actividad DPPH en la cáscara de la papa y se compara con la de su pulpa, siendo esta notablemente inferior (0,28) comparada con la cáscara 5,7 μmol Equivalentes de ácido ferúlico/g BS. Es importante mencionar que en este trabajo se reporta la actividad antioxidante de la papa completa, por tanto los valores van a ser menores en relación a la actividad de la cáscara sola, esta actividad antioxidante en los clones de papa mostró rangos de 21,137-179,281 μg ET/g. La actividad antioxidante DPPH según reportes de Lachman (Lachman *et al.*, 2008) se da en mayor proporción en tubérculos de color purpura-violeta que en amarillos.

Para la actividad captadora de radicales oxígeno (ORAC), en este estudio se presentan rangos entre 21,67-47,48 μmol ET/g BS (tabla 2-9) sin diferencias significativas entre clones. Sin embargo, se encontró relación entre la actividad ORAC y el color de la papa (Figura 2-7). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Andre en 2009 (Andre *et al.*, 2009) donde se dan rangos de 24,7-346,5 μmol ET/g BS y donde se muestra que la actividad ORAC fue mayor en genotipos de color purpura oscuro, purpura y seguida de rojo (Figura 2-7).

En otro estudio de Andre en 2007 (Andre *et al.*, 2007), evaluó 74 genotipos de papa, encontrando rangos de ORAC de 28,25 a 250,67 μmol ET/g BS. Los clones de *S. phureja* se encuentran en niveles medios de esta actividad con respecto a estos estudios. Sin embargo, en una investigación presentada por Xu en 2009 (Xu *et al.*, 2009) donde se hace cocción de los diferentes genotipos de papa, se obtiene resultados contrastantes con rangos de 6,92-18,82 μmol ET/g BS. Los datos obtenidos en este estudio sobre el poder reductor de la papa (75,14- 198,13 mg ET/100g BS) sugieren que es probable que contribuya significativamente hacia el efecto antioxidante observado.

Al-Weshahy en 2009 (Al-Weshahy *et al.*, 2009), muestra que los coeficientes de correlación entre los compuestos fenólicos en las muestras de cáscara de papa y la capacidad antioxidante por FRAP (0,91), TEAC o ABTS (0,99) y FRSA o DPPH (0,95), en este estudio se correlacionó el ácido ascórbico y clorogénico con ORAC (0,40 y 0,46

respectivamente) como se observa en la tabla 2-10. Los resultados reportados por Al-Weshahy, presentan una actividad de FRAP en rangos de 0,43-1,07 mg/100g BS, que al ser comparados con los de este estudio son menores (Tabla 2-9), lo que indica una alta reducción en el estado de valencia de los iones de hierro, por parte de los clones de papa, siendo mejores cuanto a esta actividad antioxidante.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre clones en cuanto a su actividad ORAC y ABTS dependiendo del color de la cáscara (Figuras 2.7 y 2.8). Se observó que en papa de cáscara morada se presenta una mayor capacidad antioxidante ORAC con respecto a las de cáscara amarilla y la capacidad antioxidante ABTS se ve aumentada en color de cáscara roja con respecto a la negruzca.

Tabla 2-10: Correlación entre los compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante ORAC

ORAC	
Ácido Clorogénico	0,46 (P=0,0006)
Ácido Ascórbico	0,40 (P=0,0025)

Figura 2-7: Relación entre el color de la cáscara y la capacidad antioxidante ORAC en ecotipos de *Solanum phureja*

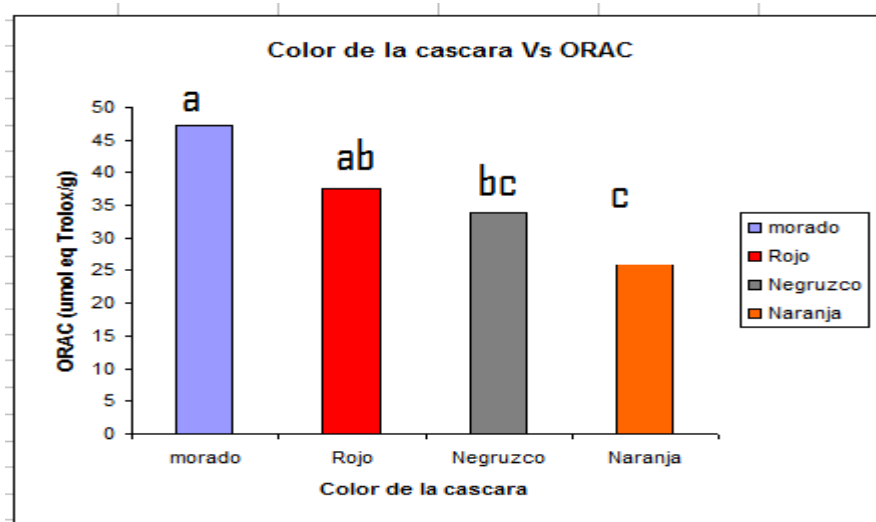
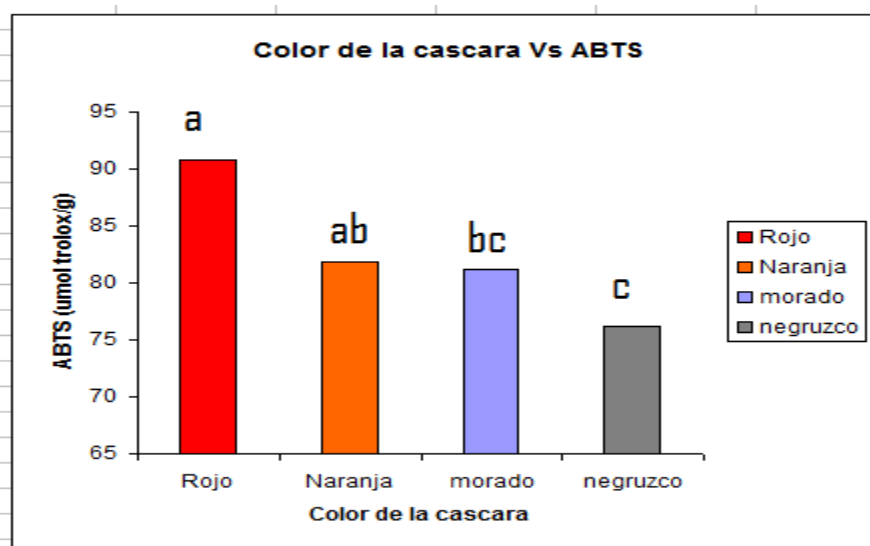


Figura 2-8: Relación entre el color de la cáscara y la capacidad antioxidante ABTS en ecotipos de *Solanum phureja*



En un estudio de Al-Weshahy en 2009 (Al-Weshahy *et al.*, 2009) menciona que los extractos de piel de papa de color rojo reducen el más que los extractos de las variedades de papa de color amarillo y blanco, similar a los resultados obtenidos en esta investigación con clones colombianos.

La actividad que reportan estas pruebas con radicales sintéticos fue importante y para complementar la información acerca de la actividad captadora de radicales libres por parte de la papa se llevaron a cabo ensayos de captación de radicales hidroxilo, peroxilo y superóxido. Para esto fue necesario realizar un análisis de puntuación ó scoring el cual consistió en darle igual valor a cada prueba debido la importancia y la información relevante de cada una, pero se tuvo como base el valor mas alto y mas bajo de cada una . En la tabla 2-11 se observa la puntuación que se le da a cada uno de los clones donde el puntaje más bajo se le asignó 0,1 0,5 al nivel medio y 1,0 al más alto. Se seleccionaron los siguientes clones: CO40, CO56, CO62, CO64 (valores altos), CO34, CO65, CO67, (valores medios) CO38, CO55 y CO63 (valores bajos) para realizar los otros ensayos de capacidad antioxidante.

Tabla 2-11: Análisis de puntaje de los clones de papa con base en su actividad antioxidante.

Clon	Muestra	ORAC	FRAP	DPPH	ABTS	ORAC	FRAP	DPPH	ABTS	PUNTAJE
15060204	CO56	39,5	198,1	178,5	101,6	0,5	1,0	0,5	1,0	102
	CO62	35,7	184,5	146,1	97,6	0,5	1,0	0,5	1,0	93
	CO40	21,7	137,1	198,2	84,2	0,1	0,5	1,0	0,5	78

	CO64	46,9	165,2	179,3	85,6	1,0	0,5	0,5	0,5	65
	CO60	47,5	150,2	148,2	82,7	1,0	0,5	0,5	0,5	60
	CO57	37,8	150,0	175,5	88,2	0,5	0,5	0,5	0,5	56
	CO41	34,8	155,7	163,5	93,6	0,5	0,5	0,5	0,5	56
	CO66	42,8	163,2	21,1	99,5	0,5	0,5	0,1	1,0	51
	CO59	50,1	134,8	90,6	79,7	1,0	0,5	0,5	0,5	51
	CO68	53,1	142,0	79,9	76,8	1,0	0,5	0,5	0,5	51
15062586	CO65	27,2	128,2	168,7	79,0	0,5	0,5	0,5	0,5	50
	CO67	28,7	125,2	170,3	73,9	0,5	0,5	0,5	0,5	50
	CO34	35,5	163,8	112,7	81,8	0,5	0,5	0,5	0,5	49
	CO33	44,1	142,3	112,8	88,2	0,5	0,5	0,5	0,5	48
	CO58	33,6	120,7	140,2	81,0	0,5	0,5	0,5	0,5	47
	CO37	31,1	138,3	114,2	80,5	0,5	0,5	0,5	0,5	46
	CO61	35,6	131,4	91,5	87,4	0,5	0,5	0,5	0,5	43
	CO45	24,9	112,0	112,0	85,7	0,5	0,5	0,5	0,5	42
	CO36	36,1	125,1	86,2	78,3	0,5	0,5	0,5	0,5	41
	CO63	40,2	154,8	53,2	93,6	0,5	0,5	0,1	0,5	37
	CO55	32,3	99,9	130,3	70,5	0,5	0,1	0,5	0,1	25
15062591	CO38	29,0	75,1	43,8	74,4	0,5	0,1	0,1	0,5	16

2.2.3.2 Captación del Radical Peroxilo, Hidroxilo y superóxido

Con base en la selección realizada se llevó a cabo la capacidad antioxidante de tres radicales específicos: Peroxilo, hidroxilo y superóxido. En cuanto a la actividad de captación de peroxilo expresado como % de inhibición de lisozima, se presentaron diferencias significativas entre clones, mostrando porcentajes de inhibición de 5 a 31%, donde el patrón utilizado (Ascorbato) presentó una inhibición del 20% (tabla 2-12), actividad similar a la reportada por otros estudios (Ospina, 1995; Mora, 2009). Esto indica una buena captación del radical peroxilo por parte de los clones de papa que puede deberse a los compuestos fenólicos existentes en cáscara y pulpa. Los porcentajes de inhibición enzimática no superaron en ningún caso el 32%. Lo que supone que aún después del daño por radicales peroxilo y/o la posible interferencia negativa de los extractos de las papas, la actividad "residual" de la enzima sería superior al 66%. Visto desde la efectividad de los extractos para captar radicales peroxilo, y teniendo en cuenta que la concentración final de los extractos en este ensayo fue de 100 µg/ml, entonces la CE50 (concentración efectiva 50 para inhibir el daño lipoperoxidativo a la lisozima) seguramente es muy inferior a 100 µg/ml, un valor promisorio cuando se trata de muestras con un tratamiento de extracción muy simple. Según este ensayo, la actividad del clon CO64 puede considerarse excelentes

como efecto protector frente a la enzima. En un grupo siguiente de efectividad se ubicarían los clones 56 y 67 (tabla 2.12).

Tabla 2-12: Captación de radicales Peroxilo, Hidroxilo y Superóxido por clones de papa S, phureja

Muestra	% Inhibición Lisozima	% de captación hidroxilo	% Inhibición NBT
patrón	20,18 ±3,13	100 ±0,51	102,59 ±3,17
CO34	27,00 ±3,08	73,01 ±0,57	37,86 ± 5,05
CO38	27,93 ±1,02	-35,35 ±5,17	35,71 ± 2,27
CO40	24,09 ±0,70	-58,03 ±1,10	41,53 ± 2,08
CO55	29,76 ±2,23	1,79 ±0,77	55,55 ± 4,90
CO56	12,41 ±1,17	74,30 ±0,45	43,47 ± 2,27
CO62	30,66 ±2,86	58,93 ±0,50	37,00 ± 1,97
CO63	31,36 ±0,68	17,05 ±1,97	42,83 ± 3,19
CO64	5,08 ±0,93	40,90 ±2,23	43,26 ± 2,91
CO65	28,21 ±2,17	-31,77 ±1,76	43,47 ± 1,97
CO67	13,14 ±2,86	16,58 ±2,42	41,85 ± 1,49

Los datos se presentan como la media de las observaciones ± Desviación Estándar.

Tabla 2-13: Actividad de absorbancias con respecto al control en la captación de radicales Peroxilo, Hidroxilo y Superóxido por clones de papa S, phureja

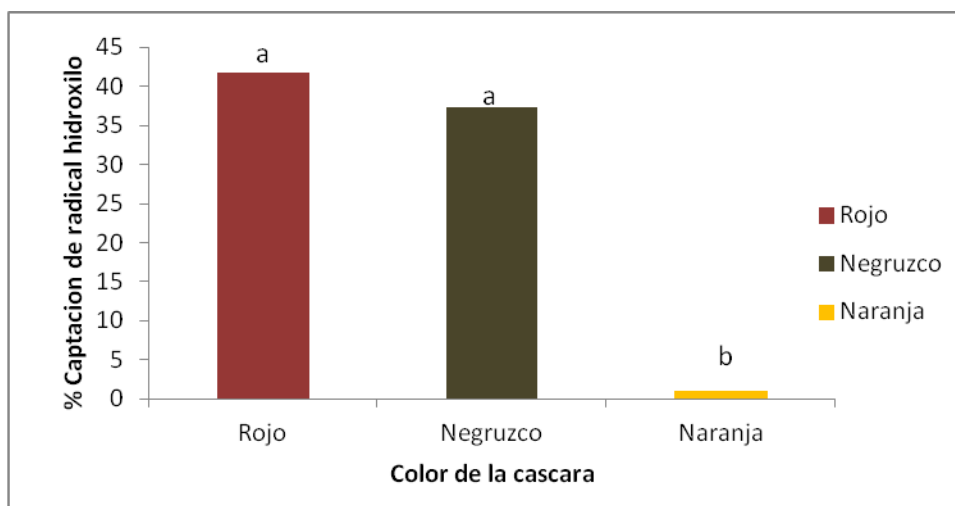
Muestra	Δ Absorbancia (x 1000) $\lambda=450$ nm	Absorbancia (x 1000) $\lambda=532$ nm	Absorbancia (x 1000) $\lambda=560$ nm
control	14,33 ± 2,04	497 ± 18,59	0
patrón	98,5 ± 26,14	71,83 ±6,28	12 ± 2,45
CO34	166,67 ± 2,07	112,67 ±27,73	62,2 ±5,17
CO38	153,17 ±30,27	588 ±22,29	64,5 ±5,57
CO40	140,67 ±8,92	672 ±11,71	60,25 ±3,40
CO55	139,67 ±17,72	555,67 ±16,91	57,25 ±17,44
CO56	24,17 ±8,17	446,83 ±23,33	59 ±12,90
CO62	152,83 ± 4,17	204 ±37,17	62,5 ±6,70
CO63	156,17 ±4,00	382 ±36,58	56,75 ±6,95
CO64	11,67 ±2,65	292,6 ±10,26	56,4 ±7,50
CO65	148 ±26,88	596,8 ±7,37	58,5 ±6,66
CO67	139,83 ±21,73	131,17 ± 29,63	59,25 ±9,33

En cuanto al radical hidroxilo, durante el ensayo control, en ausencia de ácido ascórbico, se determinó si las muestras probadas muestran un comportamiento reductor similar al del ascorbato, que pudieran llegar a generar radicales hidroxilo que degraden la desoxirribosa o si la muestra posiblemente interfiere con la desoxirribosa. En el ensayo principal claramente se muestra la actividad captadora del radical hidroxilo presentada por el patrón DMSO, como lo describen anteriores trabajos. Se presentaron diferencias entre clones con porcentajes de inhibición de 16 a 73%. En el clon 56 se observa un porcentaje alto frente al patrón DMSO, siendo este clon promisorio frente a esta actividad. Clones como CO64 y CO34 tuvieron una captación importante de 40 y 73% respectivamente. Los resultados negativos de la captación de este radical están relacionados con la actividad prooxidante (efecto reductor o interferencia con la desoxirribosa) que logra enmascarar la actividad captadora que pudiesen llegar a tener las muestras, esta actividad se puede evidenciar en las absorbancias de la tabla 2-13. De acuerdo con los resultados obtenidos tanto en el ensayo principal como en el de control, la actividad captadora de radical hidroxilo puede ser considerada excelente para el clon CO56 y teniendo en cuenta los resultados obtenidos tanto para la captación del radical peróxido como la del radical hidroxilo, puede decirse que este clon tiene un excelente potencial antioxidante *in vitro*. Con una menor actividad pero buenos resultados se resalta el Clon 64 (Tabla 2-12).

Para la captación de radicales superóxido, los resultados obtenidos presentan diferencias significativas entre clones y con respecto al patrón n-propilgalato, con rangos de inhibición de NBT de 35-55%, mostrando resultados promisorios en el clon CO55 con una captación de 55% de este radical, seguido por CO56 y CO64. Estos resultados son importantes ya que el radical superóxido se es una especie muy dañina para los componentes celulares y es precursor de otras especies reactivas de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1985) además se puede producir *in vivo* e interviene en la formación de H_2O_2 a través de una reacción de dismutación. Por otra parte, la conversión de H_2O_2 en más especies reactivas, por ejemplo, el radical hidroxilo, ha sido pensado para ser uno de los efectos desfavorables causados por los radicales superóxido (Halliwell, 1991).

La actividad de captación del radical hidroxilo se relacionó con el color de la cáscara de los tubérculo, con diferencias significativas (Figura 2-9).

Figura 2-9: Relación de la captación del radical hidroxilo con el color de la cáscara



Se establecieron correlaciones entre los compuestos presentes en los clones y la actividad de captacion de radicales hidroxilo con los respectivos coeficientes (tabla 2.14)

Tabla 2-14: Correlaciones entre la captación de radicales hidroxilo con componentes y actividad antioxidante de clones de papa.

Ensayo	Hidroxilo
Ácido Clorogénico	0,49 P<0,05
Fenoles	0,43 P< 0,05
Intensidad del Color de la cáscara	0,63 P<0,001

Este resultado es esperado ya que el modo de acción de los polifenoles, los grupos OH de los anillos pueden donar un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose en un radical relativamente estable (Heim et al., 2002) También son capaces de quelar metales, formando complejos que, aun así, mantienen la capacidad antioxidante.

2.3 Conclusiones

El mejor clon de papa fue el CO56 siendo superior a papa criolla comercial en ácido ascórbico, (46%), ácido clorogénico (48%) y fenoles totales (39%)

La capacidad antioxidante del Clon CO56 fue mejor con respecto a papa criolla para ABTS (16%) , FRAP(43%) DPPH (37%) y ORAC (35%)

La captación de radicales peroxilo fue mejor para los clones CO56 (88%) y CO64 (95%) comparado con PG (80%)

ORAC se relacionó positivamente para papas moradas y la captación de radicales hidroxilo para los clones rojos.

El contenido de ácido clorogénico presentó correlación positiva con la actividad antioxidante ORAC y con la captación de radicales hidroxilo

3 Evaluación del estatus antioxidante por *Solanum phureja* en ratas con síndrome hepatotóxico

La intoxicación por CCl_4 en animales es un modelo experimental que imita el estrés oxidativo en muchas situaciones fisiológicas (Ivor y Schneider, 2005). Diversos estudios han demostrado que esta intoxicación provoca la generación de radicales libres en muchos tejidos como hígado, riñón, corazón, pulmón, testículos, cerebro y sangre (Rechnagel *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 2005; Khan y Ahmed, 2009, Khan *et al.*, 2009). El paso inicial en la lesión tisular inducida por tetracloruro de carbono es el citocromo P450. Este proceso está mediado por la transferencia de un solo electrón al enlace C-Cl, a un anión radical como intermediario transitorio que elimina el cloro para formar un átomo de carbono radical, el radical triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$) y cloruro libre (Slater, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1984). El radical triclorometilo puede dismutar al cloroformo y se une a macromoléculas provocando un ataque a ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares. Los átomos dobles de hidrógeno alílico en estos ácidos son particularmente susceptibles a la abstracción de los radicales libres, generando cloroformo y radicales secundarios de lípidos que reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peróxido con lípidos, produciendo así radicales carbonilo como aldehídos y cetonas. El radical triclorometilo puede reaccionar también con el oxígeno para formar el radical libre peroxitriclorometil ($\cdot\text{CCl}_3\text{O}_2$). Estos radicales libres pueden unirse con ácidos grasos poliinsaturados, formaciones alquilo (R) y los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), generando peroxidación de lípidos, y por tanto daños en la membrana celular induciendo finalmente, lesión hepática o necrosis (Weber *et al.*, 2003). Además, se afecta la producción de enzimas como Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutatión Peroxidasa, entre otras, así como el aumento de los niveles séricos de Alanina Transaminasas (ALT) y Aspartato Transaminasas (AST). En este estudio

se quiso evaluar enzimas antioxidantes, marcadores bioquímicos de toxicidad y el posible efecto hepatoprotector de la papa.

3.1 Implementación del modelo de hepatotoxicidad inducida con Tetracloruro de Carbono (CCl₄.)

3.1.1 Metodología

Se empleó el modelo de hepatotoxicidad descrito por Lin en 1998 (Lin *et al.*, 1998), con algunas modificaciones. Se indujo un daño hepático por la administración de tetracloruro de carbono CCl₄ con el propósito de determinar si los liofilizados de papa, en un esquema de tratamiento curativo, podrían disminuir la hepatotoxicidad generada. Como marcadores del daño producido se evaluaron parámetros asociados al estrés oxidativo en plasma como FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) y en hígado como las enzimas Catalasa y Superóxido Dismutasa, así como la peroxidación lipídica y la oxidación de grupos carbonilos. Se ha establecido que la biotransformación del CCl₄ por el sistema citocromo P-450 produce el radical libre triclorometileno ·CCl₃. Este radical libre puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical triclorometilperoxilo, el cual puede atacar los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico, lo que desencadena una peroxidación lipídica y por consiguiente una perturbación en la homeostasis del calcio y otros cambios que finalmente resultan en la muerte celular. Un compuesto que actúe como antioxidante podría disminuir el daño producido por esta hepatotoxina por diferentes mecanismos.

3.1.1.1 Protocolo Experimental

El ensayo se desarrolló con un modelo de bloques completos al azar, bloqueando por peso. Este tuvo una duración de 5 días, tomando el primero para pesaje, distribución aleatorizada entre tratamientos y preparación de los animales para el experimento. El día 2 en la mañana se les administró una dosis de CCl₄ de 2 ml/Kg y ocho horas después se inició la administración de los tratamientos (Tabla 3.1), repitiéndose hasta el día 5 dos veces al día (mañana y tarde) en dosis de 500 mg/Kg- día. Paralelamente se llevó a cabo un ensayo control sin CCL₄ para evaluar la posible toxicidad de las muestras. El día 6, luego de tomar muestra de sangre por punción cardiaca, los animales fueron sacrificados por dislocación

cervical. El hígado fue extraído, pesado y almacenado hasta su procesamiento para la determinación de marcadores del estrés oxidativo.

Animales: Se usaron ratas Wistar entre 220-240 g de peso, estas fueron proporcionadas por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Estos se manipularon en condiciones de temperatura y luz controladas (21 ± 2 °C; períodos de 12 horas luz/ oscuridad). Se mantuvieron en ayuno el día antes de la primera administración y seguido de esto con alimento (Rodentina®) y agua *ad libitum*. El cuidado y manipulación de los animales se rigió bajo protocolos estandarizados y con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias.

Preparación de las muestras: Con los resultados encontrados en los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro*, se seleccionaron 2 clones uno con la mayor y otra la menor capacidad antioxidante con el fin de hacer un análisis de comparativo de estos dos: CO56 y CO67 respectivamente. Se utilizó como patrón de referencia Silimarina, un antioxidante natural derivado del cardo mariano. Estos liofilizados fueron suspendidos antes de cada administración en un vehículo compuesto por 10% propilenglicol, 10% glicerina y 80% agua.

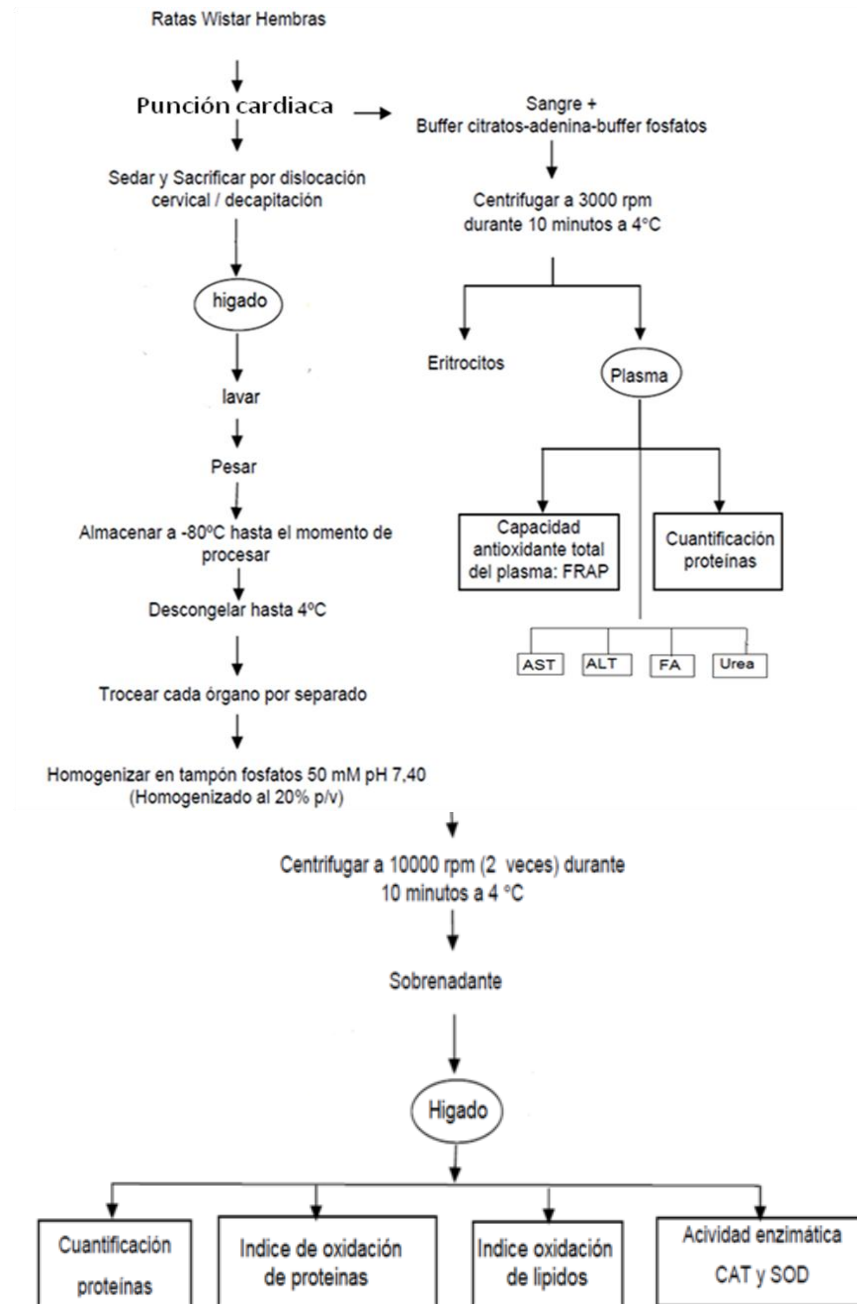
Tabla 3-1: Distribución de grupos en el ensayo de hepatotoxicidad inducido en ratas Wistar por CCl₄

Grupo	Tratamiento
1 (VH)	CCl ₄ + Vehículo
2 (SI)	CCl ₄ + Silimarina (200 mg/kg-día)
3 (CO56)	CCl ₄ + CO56 (500 mg/kg-día)
4 (CO67)	CCl ₄ + CO67 (500 mg/kg-día)
5 (E)	Aceite de Oliva + CO56 (500 mg/kg-día)
6 (F)	Aceite de Oliva + CO67 (500 mg/kg-día)
7 (V)	Aceite de Oliva + Vehículo

3.1.1.2 Tratamiento de muestras biológicas obtenidas

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos serológicos sin anticoagulante. Se centrifugaron a 3000 rpm para obtener el suero y luego fueron almacenadas a 4 °C hasta llevar a cabo los análisis bioquímicos. Los hígados fueron homogenizados para luego realizar los ensayos de estrés oxidativo, como se observa en la Figura 3.1.

Figura 3-1: Esquema general del tratamiento de las muestras de hígado y plasma obtenidas de ratas Wistar en el ensayo de hepatotoxicidad inducido por CCl₄.



3.1.1.3 Estimación de parámetros bioquímicos en sangre.

Con las muestras de sangre extraídas de las ratas de cada tratamiento se analizó el contenido de Aspartato Transaminasa (AST), Alanina Transaminasa (ALT), Fosfatasa

Alcalina (FA) y urea. Estos análisis fueron realizados por el laboratorio clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.1.4 Cuantificación de proteínas

A cada una de las fracciones de las muestras de sangre e hígado empleadas en la determinación de los marcadores de estrés oxidativo se les cuantificó el contenido de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método se basa en la reacción del azul brillante 6 ó “azul de coomasie” con las proteínas en un medio alcohólico-ácido para formar un complejo azul “proteína-colorante”, el que es medido a 595 nm y cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteína. El ensayo se efectuó en microplacas a un volumen final de 250 µl y se comparó con una curva de estándar de albúmina según el protocolo descrito en la Tabla 3.2. Para la cuantificación de las muestras de hígado y plasma se emplearon alícuotas de 50 µl de la dilución con agua 1:400 de los respectivos homogenados.

Tabla 3-2: Protocolo para la determinación de proteína en hígado y sangre

Reactivo	Ci	Blanco	Patrón	Muestra	Cf
Patrón de albúmina	100 µg/ml	-----	10* µl 20* µl 30* µl 40* µl 50 µl	-----	4 µg/ml 8 µg/ml 12 µg/ml 16 µg/ml 20 µg/ml
Agua destilada	-----	50 µl	*	-----	-----
Muestra	Dilución 1:400	-----	-----	50 µl	-----
Reactivo de Bradford	-----	200 µl	200 µl	200 µl	-----
Leer inmediatamente a 595 nm					

Completar a volumen de 50 µl con agua destilada.

3.1.1.5 Determinación de marcadores de estrés oxidativo

3.1.1.5.1 Cuantificación de la capacidad antioxidante total plasmática mediante el método de la Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma").

Este método cuantifica la capacidad de los antioxidantes contenidos en una muestra para reducir el tripiridil-triazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+}), la cual absorbe a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).

Se prepararon la siguientes soluciones:

Reactivo FRAP se preparó diariamente, mezclando:

- Solución A: 10 volúmenes de buffer acetato 300 mM (pH 3.6).
- Solución B: 1 volumen de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM.
- Solución C: 1 volumen de FeCl_3 20 mM.

Dilución de la muestra 1:37 de agua desionizada

Lectura de la muestra

200 μL de reactivo FRAP
Medir la absorbancia a 593 nm
Adicionar 30 μL de agua desionizada
Adicionar 20 μL de la dilución de la muestra
Medir la absorbancia a 593 nm a los 4 minutos.

Lectura del Blanco de la muestra

230 μL de agua desionizada.
Adicionar 20 μL de la dilución de la muestra.
Medir la absorbancia a 593 nm a los 4 minutos.

El blanco de reactivo y el blanco de la muestra se restan de la absorbancia final después de los 4 minutos y el resultado es comparado con una curva estándar preparada empleando diferentes concentraciones (100-1000 $\mu\text{mol/L}$) de FeSO_4 en agua desionizada siguiendo el procedimiento descrito. La capacidad antioxidante plasmática total se expresó como mg de FeSO_4 por miligramos de proteína de la muestra.

3.1.1.5.2 Índice de oxidación de proteínas: Cuantificación de grupos carbonilo de las proteínas

Algunas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) inducen modificaciones que pueden resultar en la alteración inmediata o posterior de la estructura de la proteína y su inactivación, que al final repercute en la pérdida de funciones a nivel celular. Muchos tipos diferentes de modificaciones oxidativas de proteínas pueden ser inducidas por EOR. La carbonilación es una modificación irreversible de tipo no enzimático. Los grupos carbonilo son introducidos en las proteínas por una variedad de vías oxidativas. Las EOR pueden reaccionar directamente con la proteína o con moléculas como azúcares y lípidos, generando productos (especies de carbonilo reactivas) que pueden reaccionar con la proteína y llevar a la formación de los derivados carbonil (aldehídos y cetonas). Los estudios acerca de la formación de los carbonilos de las proteínas no han diferenciado entre los que han sido producidos a través de la reacción directa de oxidación y los formados por la adición de moléculas previamente oxidadas, por lo que el contenido de grupos carbonilo de las proteínas debe ser considerado como un amplio marcador de la oxidación (Baltacioglu *et al.*, 2008).

Los grupos carbonilo fueron determinados mediante la técnica de Levine *et al.*, 1990) con leves modificaciones utilizando 2,4-dinitrofinilhidrazina (DNPH) de acuerdo con lo descrito por Baltacioglu en 2008 (Baltacioglu *et al.*, 2008):

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de HCl 2M
- Solución A: DNPH 10 mM en Solución de HCl 2M
- Solución B: TCA 20% frío.
- Solución C: Etanol: etil acetato (1:1)
- Solución D: Guanidina 6M

Lectura de la muestra

50 μ L de la muestra
Adicionar 250 μ L de solución A
Homogenizar
Reposar una hora a temperatura ambiente, agitando cada 15 min

Adicionar solución B
Mantener a 4°C por 15 min
Centrifugar a 11000 rpm por 5 min
Eliminar sobrenadante
Lavar pellet con 1 ml de Solución C
Centrifugar durante 7 min a 3000 rpm
Repetir lavado y centrifugado 3 veces
Disolver el pellet en la solución D
Incubar a 37 °C durante 10 min
Leer absorbancia a 360 nm

Los contenidos de grupos carbonilo fueron calculados empleando un coeficiente de absorptividad de $22,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Cada muestra fue leída frente a su muestra control (tratada con HCl 2M y no con solución A). El contenido de grupos carbonilo de las proteínas fue expresado como nmol/g proteína.

3.1.1.5.3 Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS

El estrés oxidativo incrementado y el pobre estatus antioxidante lleva al incremento de la peroxidación lipídica en los tejidos de los animales intoxicados. Las elevadas concentraciones de peróxidos lipídicos pueden propagar el daño oxidativo por el incremento de radicales peroxi e hidroxilo, contribuyendo al deterioro funcional de los diferentes órganos (Ramachandran *et al.*, 2004).

Se preparan las siguientes soluciones:

- Solución A: Tampón fosfato 50 mM pH 7,4
- Solución B: Ácido Tricloro Acético (TCA) 10%
- Solución C: Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,67%
- Solución patrón de malondialdehido (MDA) 10-100nM

Dilución de la muestra 1:10000

Lectura de la muestra

450 μ L del homogenado de hígado
Adicionar 50 μ L de solución A
Adicionar 1 ml de solución B
Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C
Tomar 1 ml de sobrenadante
Adicionar solución C
Calentar a 92°C durante 30 min
Enfriar en baño de hielo
Medir la absorbancia a 532 nm

Los resultados fueron expresados en nmol MDA/ mg de proteína con base en la curva de calibración realizada.

3.1.1.5.4 Cuantificación de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa SOD.

La actividad de la SOD en las muestras fue determinada utilizando el ensayo de la riboflavina-*o*-dianisidina descrito por Paynter en 1980 (Paynter, 1980).

Se prepararon las siguientes soluciones

- Solución A: Tampón de fosfatos, pH 7,8, 50 mM
- Solución B: EDTA 0,1mM
- Solución C: *o*-dianisidina diclorhidrato 6M en agua
- Solución D: Riboflavina 0,29 mM
- Solución E: Mezcla de reacción: 2,7 de A y B, 0,1 ml de C y 0,1 ml de D. Es estable por 12 horas si se almacena a 4°C y protegida de la luz.

Lectura de la muestra

200 μ L de la mezcla de reacción E
Adicionar 4 μ L del homogenado y/o su dilución
Incubar durante 5 min a 25°C en la oscuridad
Leer absorbancia a 415 nm
Exponer la placa a una luz de fluorescencia ubicada 5 cm de distancia durante 8 min exactos
Leer absorbancia a 415 nm

Para la construcción de la curva de calibración se reemplazó la cantidad de muestra adicionada por Superóxido dismutasa SOD a diferentes concentraciones dentro de un rango de 0,01-1 U/ml. Por interpolación en esta curva se determinó la cantidad de SOD presente en los homogenados de hígado.

Los resultados fueron expresados como Unidades de SOD / mg de proteína con base en la curva de calibración realizada.

3.1.1.5.5 Cuantificación de la actividad enzimática de la catalasa.

Este método de cuantificación empleado, descrito por Aebi (1984), se basa en el continuo incremento en la absorbancia que presenta en la región ultravioleta el H₂O₂ al disminuir la longitud de onda. La descomposición del H₂O₂ puede ser seguida directamente por el decrecimiento en la absorbancia a 240 nm. La diferencia en absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad catalasa.

La actividad de la catalasa fue cuantificada de acuerdo al método de Aebi (1984). El principio del ensayo es basado en la determinación de la constante de velocidad, k , (unidades: segundo^{-1}) para la descomposición de peróxido de hidrógeno, mediante la cuantificación del cambio de absorbancia por minuto. Las actividades se expresan como k (constante de velocidad) por miligramo de proteína.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.0.
- Solución B: Peróxido de Hidrógeno 30 mM.

Dilución de la muestra: Realizar una dilución 10:90 con buffer fosfato pH 7.0 del homogenado del tejido a evaluar inmediatamente antes de ser usada, para evitar la descomposición en subunidades de la enzima.

Lectura de muestra

250 μL de Solución B H ₂ O ₂
Adicionar en la microcelda de cuarzo a utilizar
Adicionar 5 μL de homogenado o su dilución
Adicionar 45 μL de solución A
Medir inmediatamente el cambio de absorbancia durante 30 s a 240 nm

La cantidad de catalasa se expresó como cambio de absorbancia por mg de proteína del homogenado.

3.1.1.6 Análisis Histopatológico

Los tejidos del hígado, que fueron recortados previamente en 2 mm de espesor, fueron fijados con formol tamponado durante 24 h. Los tejidos fijados fueron embebidos en parafina, seccionados y se rehidrataron. El examen histológico evaluó la toxicidad de CCl₄ inducida por necrosis mediante la evaluación de los cambios morfológicos en las secciones de hígado teñidos mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H & E). Este análisis fue realizado por el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2 Resultados y Discusión.

3.2.1 Estimación de parámetros bioquímicos en sangre.

Se analizaron las muestras de sangre de animales enfermos y sanos para determinar parámetros bioquímicos como Alanina transaminasa (ALT), Aspartato Transaminasa (AST), Fosfatasa Alcalina (AF) y urea ya que estos se utilizan como índice bioquímico indirecto del daño hepático (Klaassen y Watkin, 1984). Los resultados muestran un aumento en el contenido de estas enzimas en la sangre en los animales enfermos (tabla 3.3)

Tabla 3-3: Efecto de clones de papa sobre parámetros bioquímicos de ratas tratadas con CCl₄

Tratamiento	AST U/L	ALT U/L	FA U/L	UREA (mmol/L)
VH	1916,5 ± 83,07 a	302,51 ± 51,05 ab	201,83 ± 38,95	6,80 ± 1,84 b
SI	467 ± 14,47 b	380,32 ± 15,10 a	169,66 ± 69,13	4,27 ± 0,98 b
CO56	450 ± 85,25 b	401,40 ± 11,28 a	152 ± 47,23	4,97 ± 0,88 b
CO67	2034,5 ± 81,8 a	446,26 ± 11,41 a	155 ± 48,71	21,83 ± 8,04 a
E	140,48 ± 33,50 b	60,32 ± 16,36 c	121,30 ± 41,35	6,72 ± 1,30 b
F	130,44 ± 27,36 b	42,68 ± 3,26 c	126,22 ± 34,78	6,89 ± 1,36 b
V	123,23 ± 24,75 b	47,96 ± 2,83 c	119,63 ± 52,53	5,80 ± 1,19 b

VH: vehículo o control+CCl₄; SI: Silimarina+CCl₄; CO56 y CO67 +CCl₄; E: CO56; F: CO67; V: Vehículo. Valores promedios de cada fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre clones ($P < 0,001$).

Se observan diferencias significativas ($P < 0,001$) en el aumento de AST en el vehículo o control y los demás tratamientos exceptuando el tratamiento con el Clon CO67, asegurando su bajo efecto. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre animales sanos (Sin CCl₄) y los tratamientos de Silimarina y CO56, lo que indica que el Clon CO56 tiene un efecto protector similar al de silimarina. Los niveles de ALT aumentaron significativamente en los animales tratados con CCl₄ ($P < 0,001$), frente a los animales sanos, por tanto no se presenta un efecto protector de los tratamientos con papa ni con el antioxidante natural Silimarina. En cuanto a la cantidad de fosfatasa alcalina en sangre, no se encontraron diferencias significativas, se presenta solo una elevación numérica en el tratamiento de vehículo control, lo que coincide con lo esperado ya que es un marcador de inflamación y sólo se observa un aumento de sus niveles en sangre en el caso de inflamación en ciertas zonas, como el hígado, donde la inflamación afecta a una zona muy grande cuando hay toxicidad (Saura-Calixto *et al.*, 2006)

Los niveles séricos de ALT, AST y los niveles de FA se determinaron para evaluar la función hepática (Degirmenchi *et al.* 2006). El aumento en los niveles de aminotransferasas puede ser debido al daño celular en el hígado inducido por el CCl₄. A pesar que ALT también está presente en las mitocondrias y el citosol, la forma mitocondrial es baja en actividad y es muy inestable. El mecanismo detallado por el cual las enzimas se liberan desde el citosol y las mitocondrias de los hepatocitos no se conoce completamente. Sin embargo, los estudios experimentales han demostrado que los cambios sutiles en la membrana son suficientes para permitir el paso de las enzimas intracelulares en el espacio extracelular. Un amplio gradiente de concentración entre los hepatocitos y el espacio sinusoidal es aprovechado por algunas enzimas. Daños celulares aumenta la permeabilidad causando que isoenzimas citosólicas que se derrame en los sinusoides y de ahí pasan a sangre periférica (Garella, 1997). En este estudio se vio el efecto celular positivo sobre AST y fosfatasa alcalina, pero no fue tan eficiente para ALT. Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre el efecto de la intoxicación por CCl₄ en las concentraciones de ALT y AST están de acuerdo con lo reportado por otros autores que emplearon este mismo biomodelo (Berry *et al.*, 1992; Mitra *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 1998). Los estudios realizados por Romero en 1998, muestran que la intoxicación por CCl₄ induce cambios en

el proceso de síntesis de proteínas y los niveles de ADN se reducen y esto se acompaña con el aumento de las concentraciones de ALT y AST. El mismo patrón de las concentraciones de ALT y AST, también se observó en un estudio reciente en el que se investigó el efecto de la proteína de semilla de calabaza aislada en la lesión hepática inducida por CCl₄ (Nkosi *et al.*, 2005). Sin embargo, las concentraciones reducidas de AST, como resultado de la administración de clon de papa CO56 y silimarina observadas durante el presente estudio, probablemente podría ser debido en parte a la presencia de compuestos antioxidantes.

Los niveles de Úrea en el plasma de los animales tratados se vio aumentado significativamente ($P < 0,001$) con respecto al control en el tratamiento con CO67 que es el clon con menor capacidad antioxidante *in vitro*. Los valores obtenidos coinciden con lo reportado por Khan en 2010 (Khan *et al.*, 2010), donde los valores entre animales tratados con CCl₄ y los animales sanos no presentan diferencias significativas, solo se muestra un cambio en uno de los tratamientos con CCl₄, por tanto se puede plantear que el hígado llevó a cabo la conversión del amoníaco tóxico en niveles moderados de urea, exceptuando los animales tratados con CO67.

3.2.2 Cuantificación de proteínas

Para el análisis de los marcadores de estrés oxidativo fue necesario determinar la proteína en hígados y sangre de las ratas. Se presentan diferencias ($P < 0,001$) entre el vehículo con CCl₄ y animales sanos (F), lo que muestra que en animales con daño hepático se disminuye notoriamente la cantidad de proteínas, probablemente debido a la inhibición en la incorporación de aminoácidos a las proteínas del hígado, disminuyendo así la función de metabolizadora. En los tratamientos con papa y silimarina se mostró la misma tendencia comparado con sus controles sanos (Tabla 3.4).

Tabla 3-4: Contenido de proteína en hígado de ratas tratadas con CCl₄

Tratamiento	proteína mg/ml
VH	1245 ±4,46 c
SI	1595 ±3,52bc
CO56	1646 ±3,27bc
CO67	1857 ±8,11bc

E	2426 ±10,34 abc
F	3246 ±8,46,46a
V	2855 ±13,50ab

Valores promedios de cada fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre clones ($P < 0,001$). Se presentan como \pm Desviación Estándar.

3.2.3 Determinación de marcadores de estrés oxidativo.

Se determinaron los siguientes marcadores donde se pudiera evidenciar el efecto de los tratamientos con papa frente a animales tratados con CCl_4 :

3.2.3.1 Cuantificación de la capacidad antioxidante total plasmática mediante el método de la Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma").

Los resultados obtenidos en esta prueba muestran diferencias ($P < 0,001$) entre el tratamiento vehículo con CCl_4 y los tratamientos con papa CO56 y silimarina, sin diferencias significativas entre estos dos últimos (tabla 3-5), siendo este un resultado importante, teniendo en cuenta a pesar de que los extractos de papa fueron administrados en una dosis 2.5 veces mayor que silimarina, este es solo un extracto acuoso mientras silimarina es un compuesto puro. Los animales sanos no presentaron diferencias entre ellos como se observa en la tabla. La actividad del clon CO56 sobre los niveles de FRAP podría ser atribuida a la presencia de compuestos fenólicos como lo sustenta diferentes investigaciones (Cao *et al.*, 1998; Molan, 2008).

3.2.3.2 Índice de oxidación de proteínas: Cuantificación de grupos carbonilo de las proteínas

La presencia de grupos carbonilo puede indicar que la proteína ha sido sometida a daño oxidativo de los radicales libres (Zwart *et al.*, 1999). En este caso se presentó un efecto modulador por parte de los clones de papa y silimarina con respecto a la presencia de grupos carbonilo como producto de la hepatotoxicidad, mostrando diferencias significativas frente al vehículo control con CCl_4 , donde se presenta una oxidación mayor de proteínas con un incremento del 65% (tabla 3-5) como era de esperarse según lo reportado por otros autores (Sundari *et al.*, 1997), comparado con animales sanos, mientras que con Silmarina y papa se evita que suban los niveles en un 50% . Los resultados son similares a los

reportados por Hsun-Lang y Wen-Chuan en 2008 (Hsun-Lang y Wen-Chuan, 2008) en un estudio con aceite de maíz induciendo fibrosis con CCl₄

En este caso, se encontró que la silimarina y los clones CO56 y CO67, disminuyen significativamente la oxidación de grupos carbonilos frente al grupo VH. Este hecho puede estar relacionado con la presencia de grupos fenólicos (discutidos en el capítulo 2) ya que, como lo plantean otros autores, existe un efecto protector sobre las proteínas ante la presencia de radicales libres por medio de la acción de grupos fenólicos actuando como antioxidantes, (Díaz y Membrillo, 2006). Este resultado es muy importante ya que existen modificaciones extensas en cadenas laterales de las proteínas producto de la oxidación generando grupos carbonilo como aldehídos y cetonas, produciendo una oxidación directa de aminoácidos como prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con las especies reactivas de oxígeno, lo que llevaría a la inactivación de la proteína y su posible desnaturalación.

3.2.3.3 Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS

El incremento de la peroxidación lipídica, evaluada por los niveles elevados de TBARS después de la administración CCl₄, ha sido bien documentado en los algunos órganos como hígado y riñón (Khan *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010). Esta peroxidación lipídica puede ser consecuencia de un incremento en la formación de radicales libres de oxígeno generados por CCl₄ ya que los sistemas de defensa antioxidantes se ven comprometidos (Priscila y Prince, 2009). La elevación de los niveles de MDA, que es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica en el tejido hepático, es uno de los indicadores más importantes de estrés oxidativo en las ratas tratadas con CCl₄ (Souza *et al.*, 1997). En este estudio, la administración de CCl₄ en una única dosis de 2 ml/Kg aumentó la peroxidación lipídica en un 97% respecto a los animales sanos (grupo V). El tratamiento con papa en dosis repetidas redujo significativamente ($P < 0,001$) el alcance de la peroxidación causada por CCl₄ frente al grupo vehículo (VH) (tabla 3-5). Esta recuperación de la peroxidación podría ser uno de los mecanismos de protección de la papa contra la toxicidad causada por CCl₄, directamente relacionada con su actividad antioxidante de sus compuestos como se ha demostrado en otros estudios con sustancias puras o extractos de plantas como *Geodorum laxiflorum* (Wendel *et al.*, 1987; Johnston y Kroening, 1998). Para otros antioxidantes

conocidos, como el ácido ascórbico, la vitamina E y compuestos de extractos naturales como los de ajo, se ha demostrado que se reduce notablemente la peroxidación lipídica a través de la reducción de los niveles de radicales libres, razón por lo cual pueden ofrecer protección contra la hepatotoxicidad inducida por CCl₄ (Lin *et al.*, 1998; Sheweita *et al.*, 2001). Esto también sugiere que el mecanismo de defensa contra las especies reactivas de oxígeno y por lo tanto el potencial antioxidante de papa son promisorios frente a este fenómeno. Resultados similares fueron reportados por Khan y Ahmed en 2009 (Khan y Ahmed, 2009) y Khan en 2009 (Khan *et al.*, 2009) quienes estudiaron estudio de los efectos protectores de *Digera muricata* en el mismo modelo. Existe la posibilidad de que los clones de papa tengan un efecto protector a la peroxidación lipídica inducida por CCl₄ a través de una menor producción de derivados de radicales libres y se evidencia en la mejora de niveles de TBARS.

3.2.3.4 Cuantificación de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa SOD.

Para evitar desequilibrios redox y el daño oxidativo, los organismos aeróbicos poseen un eficiente sistema de defensa bioquímica incluyendo enzimas, tales como la SOD, que sin embargo, no pueden proporcionar una protección completa contra el ataque de las especies reactivas de oxígeno en condiciones de estrés oxidativo severo (Goldstein y Araujo, 1995). Por lo tanto, diversos estudios se han estado encaminado a encontrar sustancias bioactivas que posean la capacidad citoprotectora contra el daño oxidativo celular, así como la capacidad de mejorar en las actividades de las enzimas antioxidantes. La Superóxido Dismutasa (SOD) cumple un papel importante al dismutar los radicales superóxido mediante su conversión a peróxido de hidrógeno. Durante la lesión hepática evaluada en este estudio, radicales hidroxilo y superóxido se generan en el lugar del daño y la actividad de enzima SOD se aumenta como consecuencia del estrés oxidativo causado por CCl₄ como se vio en el grupo control (VH). La actividad SOD fue reducida por el tratamiento con CO56 y con silimarina en las ratas (tabla 3-5). Estos resultados, evidentemente, se relacionan con la capacidad antioxidante de la papa frente a radicales hidroxilo y superóxido (capítulo 2). El tratamiento con el clon CO56 y silimarina disminuyen la actividad de SOD. La reducción observada en el vehículo control con CCL4 puede asociarse en parte a una inactivación de la enzima por las elevadas concentraciones de EROs y en parte, a una glicación no enzimática que también puede inactivar a las enzimas (Ugochukwu y

Cobourne, 2003; Jin *et al.*, 2008). Los tratamientos sin CCL₄ se mantuvieron con los niveles normales de SOD.

3.2.3.5 Cuantificación de la actividad enzimática de la catalasa

La Catalasa como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H₂O₂ generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Esta actividad se vio aumentada en el grupo control (VH) con CCl₄, con diferencias significativas con el tratamiento de CO56 sin CCl₄ (E). En estos resultados se observa cómo responde el sistema con una disminución marcada de esta enzima en el tratamiento de CO56 con CCl₄ (85%), con silimarina (75%) y CO67 (79%). Estos resultados son similares a los expuestos por Singh en 2008 (Singh *et al.*, 2008), donde se determina la actividad de catalasa en animales con CCl₄ y tratados con piel de papa en donde se muestra la disminución de la enzima frente al grupo control sano (sin CCl₄) (tabla 3-5). Estos resultados también son similares a los reportados por Khan y Sidique en 2010 (Khan y Sidique, 2010), donde se ve la disminución de la actividad de la enzima al evaluar el efecto del extracto clorofórmico de *Citharexylum spinosum* en tratamientos con CCl₄. La disminución de la actividad de catalasa está vinculada al agotamiento de la enzima como consecuencia del estrés oxidativo causado por CCl₄, posteriormente fue llevada a cerca de lo normal después del tratamiento con papa, en las ratas tratadas con CCl₄, lo que podría suponer la propiedad antioxidante sobre los radicales libres de oxígeno ya que esta enzima reaccionó con el peróxido de hidrógeno disponible, metabolizándolo a agua y oxígeno.

Tabla 3-5: Marcadores de estrés oxidativo en ratas tratadas con CCl₄

Tratamiento	FRAP $\mu\text{mol/mg}$ proteína	COP (nmol/mg proteína)	TBARS (nmol MDA/mg proteína)	SOD U/mg proteína	CAT ($\times 10^{-3}$ K (s mg proteína) ⁻¹)
VH	450,055 \pm 4,91 a	5,780 \pm 0,19 a	9,286 \pm 0,36 a	1,99 \pm 0,13 c	2,693 \pm 1,19 b
SI	297,971 \pm 5,61 b	3,089 \pm 0,38 b	4,462 \pm 0,12 c	1,175 \pm 0,26 a	1,001 \pm 0,77 cd
CO56	278,836 \pm 5,58 b	3,019 \pm 0,30 b	5,819 \pm 0,14 b	1,296 \pm 0,41 a	0,645 \pm 0,60 d
CO67	87,478 \pm 4,87 c	3,745 \pm 0,06 b	6,017 \pm 1,04 b	0,594 \pm 0,15 b	0,908 \pm 0,41 cd
E	74,553 \pm 4,44 c	1,706 \pm 0,93 c	4,575 \pm 0,19 c	0,610 \pm 0,23 b	4,572 \pm 0,92 a
F	79,091 \pm 3,18 c	1,402 \pm 0,57 c	5,105 \pm 0,45 c	0,689 \pm 0,09 b	2,373 \pm 0,42 bc
V	86,298 \pm 5,86 c	1,436 \pm 0,56 c	4,697 \pm 0,32 c	0,601 \pm 0,63 b	2,352 \pm 0,47 bc

FRAP: Capacidad del plasma para reducir hierro. COP: Cuantificación de oxidación de proteínas. TBARS: Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico. SOD: Superóxido dismutasa. CAT: Catalasa. Los datos se presentan como la media de las observaciones \pm Desviación estándar. Valores promedios de cada fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre clones ($P < 0,05$)

3.2.4 Análisis Histopatológico

Según el diagnóstico presentado en la tabla 3-6, la administración de CCl_4 durante una semana produjo una marcada inflamación, necrosis microvacuolar y esteatosis micro y macrovacuolar del hígado. De acuerdo con las observaciones microscópicas de secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina, la fibrosis se incrementó notablemente en las ratas tratadas con CCl_4 , pero se vio reducida en las ratas tratadas con CO56 y silimarina. También reveló que el tratamiento con CO56 fue el único tratamiento que logró inhibir la necrosis hepática, así mismo esteatosis o hígado graso que es producto de la peroxidación lipídica. Para los tratamientos con Silimarina se observaron cambios grasos en el tejido en más de un 70%, para CO67 en un 90% mientras para CO56 solo se describe como moderado.

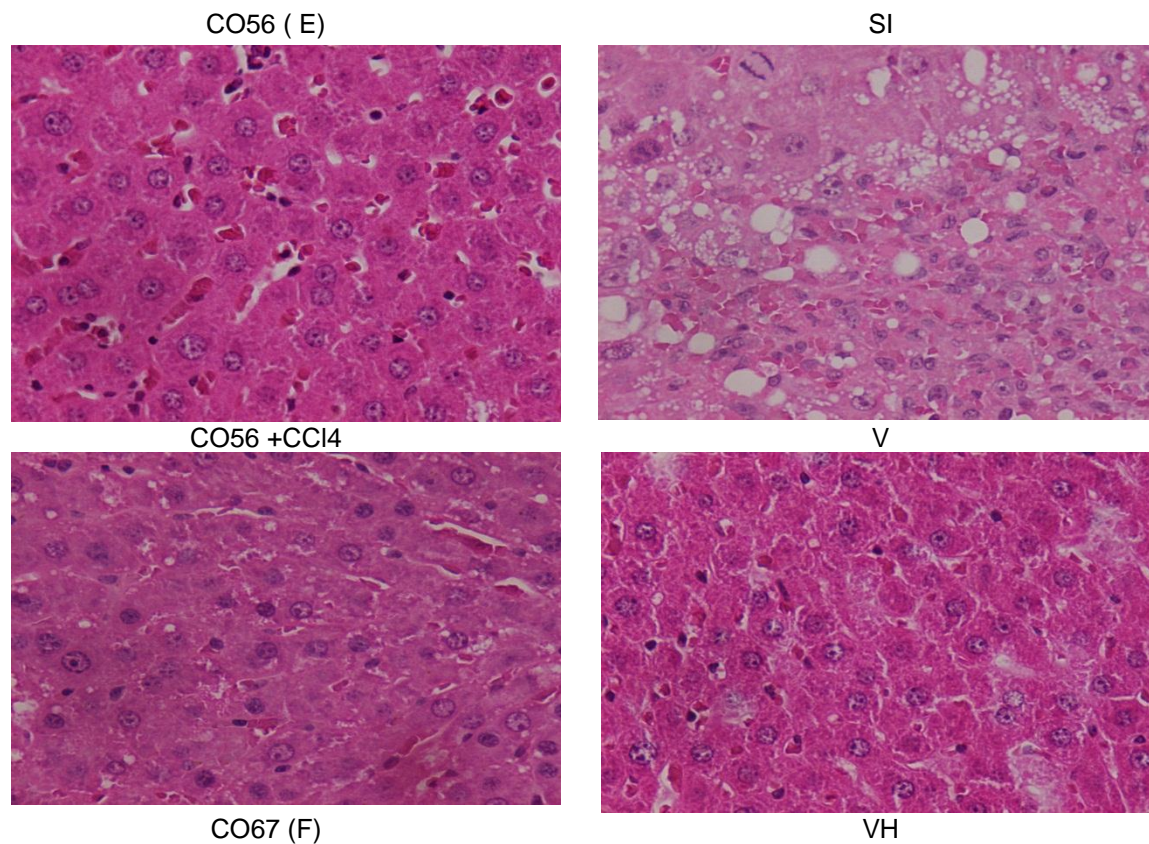
Los estudios histopatológicos mostraron que CCl_4 induce una degeneración marcada en los hepatocitos y necrosis focal. Sin embargo, en este estudio las ratas tratadas con papa, las lesiones inducidas por CCl_4 disminuyen notablemente, como se puede observar en la figura 3-2. Estos datos están de acuerdo con los resultados de las actividades de aminotransferasa sérica que aumentan progresivamente en alteraciones de toxicidad aguda en hígado (Kanel y Korula, 2000), además de los niveles hepáticos de la peroxidación lipídica. El tratamiento de papa sin CCl_4 por sí solo no causó ningún cambio en la histología hepática, descartando cualquier posible respuesta de toxicidad. Estos resultados se pueden comparar con los reportados por Singh en 2008 (Singh *et al.*, 2008), donde un extracto de piel de papa inhibe la proliferación de radicales libres en tratamientos con CCl_4 y son evidenciados por los análisis histopatológicos. Con respecto a los infiltrados linfocitarios en silimarina y CO56, para CO67 hubo cambios moderados.

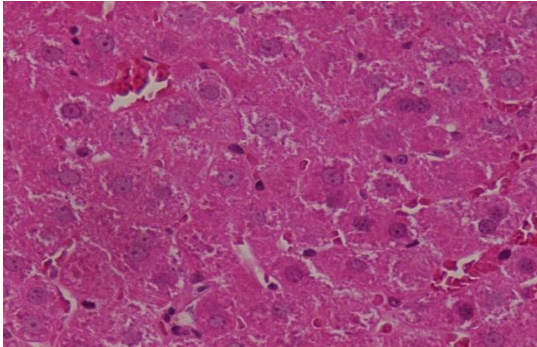
Tabla 3-6: Resultados de análisis histopatológico en hígados de rata tratados con CCl_4

Tratamiento	Diagnóstico
VH	Necrosis Hepática submasiva
SI	Necrosis Hepática sin inflamación
CO56	Esteatosis Hepática macro y microvacuolar
CO67	Esteatosis Hepática microvacuolar con inflamación y necrosis
E	Histología Normal, con presencia ocasional de hepatocitos con esteatosis
F	Histología Normal
V	Histología Normal

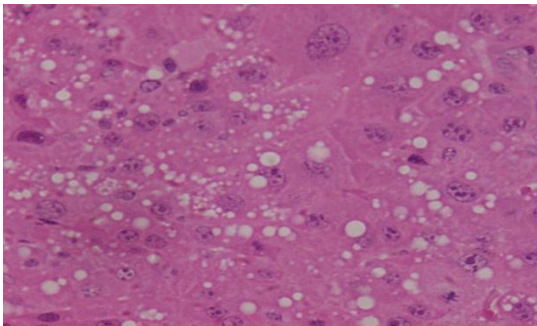
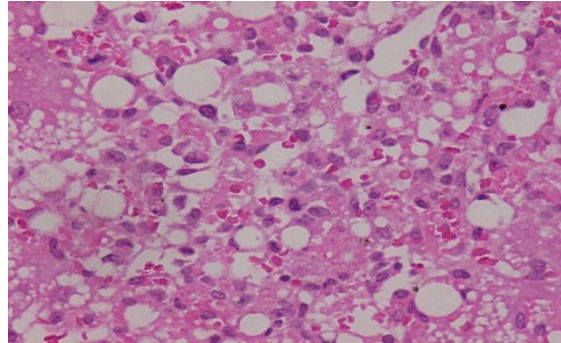
En este estudio se comprobó el efecto hepatoprotector de papa especialmente del clon CO56 frente a un daño hepatotóxico con CCl₄, comparado con un antioxidante natural como silimarina.

Figura 3-2: Histopatología de hígados de rata con síndrome hepatotóxico





CO67+CCL4



Grupo	Tratamiento
1 (VH)	CCl ₄ + Vehículo
2 (SI)	CCl ₄ + Silimarina (200 mg/kg-día)
3 (CO56)	CCl ₄ + CO56 (500 mg/kg-día)
4 (CO67)	CCl ₄ + CO67 (500 mg/kg-día)
5 (E)	Aceite de Oliva + CO56 (500 mg/kg-día)
6 (F)	Aceite de Oliva + CO67 (500 mg/kg-día)
7 (V)	Aceite de Oliva + Vehículo

3.3 Conclusión

La actividad de ALT y FRAP fue similar para silimarina y el Clon CO56 en un 90% y 93% respectivamente

El índice de grupos carbonilo fue similar en un 93% para los clones de papa comparados con silimarina

La actividad de SOD del Clon CO56 fue similar a silimarina en 90%

El clon de papa CO56 tiene un potente efecto protector contra el estrés oxidativo y el daño hepático agudo inducido por CCl₄ en ratas Wistar.

4 Evaluación de la suplementación de materiales de papa como aditivo nutraceutico en sistemas de alimentación de pollos de engorde.

La carne de pollo, entre otros productos de consumo generalizado, tienen muchas características deseables de nutrición, tales como el contenido bajo de lípidos y concentraciones relativamente altas de ácidos grasos poliinsaturados, que pueden potenciarse aún más mediante estrategias específicas de la dieta (Bourre, 2005). Sin embargo, un alto grado de poliinsaturación acelera los procesos oxidativos que conducen a un deterioro en el sabor de la carne, color, textura y valor nutricional (Mielnick *et al.*, 2006). Las estrategias más comunes para la prevención de la oxidación de lípidos son el uso de antioxidantes y la restricción de acceso al oxígeno durante el almacenamiento por el envasado al vacío (Tang *et al.*, 2001). Aditivos antioxidantes se añaden a las carnes procesadas frescas y para prevenir la rancidez oxidativa, retardan el desarrollo de sabores no deseados y mejorar la estabilidad del color (Ahn *et al.*, 2002). Los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) se han utilizado para el control de la oxidación de lípidos en la carne. Sin embargo, el uso de estos antioxidantes sintéticos está restringido en algunos países debido a sus efectos tóxicos o cancerígenos (Hirose *et al.*, 1998; Pokorny, 1991). La estabilidad oxidativa de la carne de ave depende en gran medida de la adición a la dieta de Vitamina E o acetato de α tocoferol (Wen *et al.*, 1997). Sin embargo, esto presenta una serie de inconvenientes que incluyen su origen sintético y bioeficacia baja (Allard *et al.*, 1997). En vista de estos inconvenientes, se ha

incrementado considerablemente el interés en el uso de antioxidantes naturales en la última década.

4.1 Metodología

Se seleccionaron tres variedades de papa comercial y un clon promisorio del Banco de Germoplasma curaduría de CORPOICA, el CO67, el cual presenta actividad antioxidante frente al estrés oxidativo en ratas con síndrome hepatotóxico (capítulo 3), no se pudo seleccionar el mejor clon con respuesta frente a la hepatotoxicidad el cual fue el CO56 debido a que la producción en campo de este clon es muy baja y las cantidades necesarias para este ensayo eran superiores a lo cosechado. Los materiales de papa fueron lavados, cocidos y secados en uno horno a 50°C con el fin de ser incluidos en un sistema de alimentación de pollos de engorde y evaluar su efecto sobre el control de la oxidación de lípidos en la carne de pollo. Inicialmente se determinó la actividad antioxidante in vitro (tabla 4-1) y con este dato se llevó a cabo las inclusiones en la dieta de los pollos.

Tabla 4-1: Capacidad antioxidante DPPH de los materiales de papa

Material de papa	ABTS ug ET /g BS	DPPH ug ET/g BS	FRAP mg ET/100g BS
Tocarreña	31,572	11,576	28,279
Criolla Colombia	15,882	6,519	30,699
Pastusa	16,421	6,129	94,673
CO67	16,859	4,572	53,689

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones avícolas de la Corporación Agropecuaria Colombiana Corpoica CI-Tibaitatá, ubicado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca) a 2650 msnm., con una temperatura promedio de 14.5°C y humedad relativa promedio de 76%.

Se midió la actividad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP y ORAC) en las materias primas utilizadas en la formulación comercial de alimento para aves, papa y dos antioxidantes (BHT y vitamina E) (Tabla 4-2). Se escogieron los datos arrojados por la prueba DPPH ya es la única que tiene los dos mecanismos SET (Single Electron transfer) y HAT (Hydrogen atom transfer), sensibles para muestras hidrosolubles y hidrofóbicas, (Saura-Calixto *et al.*, 2002; Castel *et al.*, 2010) este compuesto puede aceptar un electrón o radical hidrógeno

para tornarse a una molécula estable, una vez reducido por un antioxidante su coloración disminuye y el progreso de la reacción puede ser monitoreado por un espectrofotómetro. Por tanto se seleccionó DPPH como parámetro de medida de capacidad antioxidante en las muestras.

Posteriormente se formuló una dieta basal de acuerdo a los requerimientos nutricionales definidos por las tablas Brasileñas de Alimentación (Rostagno, 2005), a la dieta basal se le adicionó 200 ppm de BHT y al llevar a cabo el análisis de DPPH de esta dieta fue 36 μg ET/g BS, mayor que la dieta control cuya actividad DPPH fue de cercana a 0.

Se determinó previamente y a diferentes concentraciones de inclusión que para que la dieta con Vitamina E tuviera la misma actividad que la dieta con BHT se debía incluir en 300 ppm. Para el caso de los cuatro materiales de papa evaluados, se estableció que, para que se tuviera la misma actividad DPPH del BHT (36 μg ET/g BS) se debía adicionar la papa en diferentes niveles de inclusión para poderlos comprar y establecer el efecto antioxidante. Los porcentajes de inclusión de los materiales de papa se presentan en la tabla 4-3. Debido al bajo nivel de inclusión de papa en la dieta (0,31-0,79%) con el nivel base de DPPH, se evaluaron 3 niveles por encima de esta actividad: el primer nivel quedó de 36 μg ET/g BS, el segundo nivel 4 veces mayor, equivalente a 144 μg ET/g BS, el tercer nivel 7 veces mayor, equivalente a 252 μg ET/g BS y el cuarto nivel 10 veces mayor, para una actividad DPPH de 360 μg ET/g BS (Tabla 4-3).

Para evaluar el efecto antioxidante de la papa en un sistema de alimentación de pollo de engorde se evaluaron los siguientes tratamientos:

- Dieta basal sin suplementar
- Dieta basal + BHT (36)
- Dieta basal + vitamina E (36)
- Dieta basal + *S. phureja* clon C067 nivel 1(36)
- Dieta basal + *S. phureja* clon C067 nivel 2 (144)
- Dieta basal + *S. phureja* clon C067 nivel 3(252)
- Dieta basal + *S. phureja* clon C067 nivel 4 (360)
- Dieta basal + *S. phureja* variedad Colombia nivel 1(36)
- Dieta basal + *S. phureja* variedad Colombia nivel 2(144)
- Dieta basal + *S. phureja* variedad Colombia nivel 3(252)

- Dieta basal + *S. phureja* variedad Colombia nivel 4(360)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Pastusa nivel 1(36)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Pastusa nivel 2 (144)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Pastusa nivel 3(252)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Pastusa nivel 4(360)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Tocarreña nivel 1(36)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Tocarreña nivel 4(144)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Tocarreña nivel 7(252)
- Dieta basal + *S. tuberosum* variedad Tocarreña nivel 10 (360)

Número entre paréntesis actividad DPPH de la dieta por encima de la dieta basal.

Tabla 4-2: Capacidad antioxidante DPPH de los ingredientes de la dieta.

Ingrediente	DPPH µg ET/g BS
Maíz	1,84
Harina de arroz	1,62
Salvado de trigo	2,12
Torta de soya	1,78
Soya extruida	1,10
Harina pescado	4,38
Aceite pescado	50,67
<i>S. tuberosum</i> variedad Tocarreña	11,58
<i>S. tuberosum</i> variedad Pastusa	6,13
<i>S. phureja</i> variedad Colombia	6,52
<i>S. phureja</i> clon C067	4,57
BHT	179,00
Vit E	120.50
Rx minerales	13,25

Tabla 4-3: Porcentaje de inclusión de papa en dietas con diferente actividad de DPPH

Actividad DDPH	36	144	252	360
	% de inclusión de papa			
<i>S. tuberosum</i> variedad Tocarreña	0,31	1,24	2,18	3,11
<i>S. tuberosum</i> variedad Pastusa	0,59	2,35	4,11	5.87
<i>S. phureja</i> variedad Colombia	0,55	2,21	3,87	5,52
<i>S. phureja</i> clon C067	0,79	3,15	5,51	7,87

Se utilizaron 456 pollos de engorde los cuales fueron distribuidos completamente al azar en 19 tratamientos al día de edad en jaulas experimentales verticales en una relación de 4 réplicas por tratamiento con 6 pollos por réplica. Durante este, el alimento y el agua se suministraron a voluntad. La iluminación para la primera semana fue continua y a partir de la segunda semana se contó con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Las aves fueron vacunadas a los 7 días de edad contra New Castle vía ocular.

Al final del ciclo comercial (42 días de edad) se sacrificaron 80 pollos, 1 pollo por replica para un total de 4 pollos por tratamiento) mediante sangría de la yugular a nivel del paladar, luego pasaron a la línea de sacrificio por escaldado (55-60 °C), pelado mecánico y eviscerado manual.

4.1.1 Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma")

Para cuantificar la capacidad de los antioxidantes contenidos en el plasma y reducir el tripiridil-triazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+}) se corrió la prueba de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), es el único método que no se basa en la captación de radicales libres sino en la capacidad de reducción de compuestos metálicos, que en el organismo pueden actuar como prooxidantes. En este método, en un medio ácido, el complejo hierro-tripiridil triazina se reduce a su forma ferrosa y coloreada en presencia de un antioxidante, produciendo un aumento en la absorbancia a 595 nm. Se tomaron muestras de sangre de pollos suplementados con antioxidantes y con papa a tres niveles de actividad DPPH.

4.1.2 Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS

Con el fin de determinar la actividad antioxidante de la papa sobre la carne de pollo se estandarizó la técnica de TBARS la cual se basa en la medida de la absorbancia a 532-535 nm de un complejo cromógeno formado entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído (MDA), siendo éste un producto secundario de la oxidación lipídica, formado a partir de ácidos grasos poliinsaturados de al menos 3 enlaces. Cuanto más efectivos sean los antioxidantes presentes en la muestra, menor será la cantidad de MDA generado, y, por

tanto, la absorbancia medida (Fernández *et al.*, 1997). Se tomaron 50 g. de muestras de pechuga y pierna del lado izquierdo del ave de 1 pollo por replica experimental para un total de 4 réplicas por tratamiento (80 pollos). La muestra se almacenó a -20°C y se liofilizó para su posterior análisis.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

M = Media poblacional

T = Efecto de tratamientos

i = 1, 2, 3.....19

j = 4 réplicas

E = Error experimental

Y= TBARS en pechuga y pierna-pernil ó FRAP.

Los datos fueron analizados por ANOVA usando el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS versión 9.2. Cuando se presentaron diferencias significativas las medias se compararon por contrastes a través de una prueba planeada (Tabla 4.4).

Tabla 4-4: Contrastes ortogonales establecidos para evaluar el efecto antioxidante de la papa

Contrastes
Control vs resto
BHT Vs Antioxidantes Naturales
Vit E Vs papa
BHT 36 vs VitE 36
BHT 36 vs papa 36
BHT 36 vs papa 144
BHT 36 vs papa 252
BHT 36 vs papa 360
VitE 36 vs papa 36

VitE 36 vs papa 144
VitE 36 vs papa 252
VitE 36 vs papa 360
S. phureja vs S. tuberosum
<i>S. phureja</i> clon C067 vs <i>S. phureja</i> Colombia
S. tuberosum Pastusa vs S. tuberosum Tocarreña

4.2 Resultados y Discusión

El grado de oxidación de la carne de pollo en dietas enriquecidas con ácidos grasos insaturados como omega 3 (aceite de pescado) por efecto de la inclusión de papa con diferentes niveles de actividad de DPPH fue evaluado a través de las prueba TBARS en carne de pollo y para evaluar el efecto antioxidante de papa en fluidos biológicos se hizo por FRAP en plasma.

4.2.1 Capacidad del Plasma para Reducir el Hierro (FRAP "Ferric Reducing Ability of Plasma")

Los resultados de la prueba FRAP la cual mide la capacidad del plasma para reducir compuestos metálicos, que en el organismo pueden actuar como prooxidantes, se muestran en las tabla 4-5 y presentan la actividad en pollos de engorde suplementados con antioxidantes y con papa con diferentes niveles suplementación de los materiales de papa.

Los pollos sin suplementación mostraron 40,28 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína en actividad FRAP menor que la de los pollos suplementados con antioxidantes y con papa ($P < 0.005$). El antioxidante BHT presentó mayor actividad FRAP que la observada en pollos suplementados con vitamina E y con papa con niveles de actividad DPPH de 36 y 144 ($P < 0.05$, no se presentaron diferencias significativas con los niveles de DPPH de papa de 252 y 360, indicando que a estos niveles la papa puede reemplazar el efecto antioxidante del BHT).

La suplementación de papa con niveles de DPPH de 252 y 360 superó la actividad FRAP de la vitamina E en 7.19 y 9.53 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, respectivamente ($P < 0.01$). La variedad Tocarreña presentó mayor actividad antioxidante FRAP en 9.53 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, comparada con la variedad

Pastusa. Comparando los materiales de papa utilizados en esta prueba el mejor resultado fue para Tocarreña.

Tabla 4-5: Contrastes del efecto de la papa sobre la capacidad antioxidante FRAP

Contraste				Valor-P
Control vs Demás tratamientos	40,28	Vs	50,07	0,0002
BHT Vs Antioxidante Naturales	54,93	Vs	49,50	0,0238
Vit E Vs papa	44,932	Vs	49,50	0,0556
BHT Vs papa Nivel 36	54,93	Vs	44,51	0.0002
BHT Vs papa Nivel 144	54,93	Vs	44,53	0.0002
IBHT Vs papa Nivel 252	54,932	Vs	52,12	0.2781
BHT Vs papa Nivel 360	54,932	Vs	56,84	0.4528
Vit E Vs papa Nivel 36	44,93	Vs	44,51	0.8695
Vit E Vs papa Nivel 144	44,93	Vs	44,53	0.8763
Vit E Vs papa Nivel 252	44,93	Vs	52,12	0.0070
Vit E Vs papa Nivel 360	44,93	Vs	56,84	<.0001
S. phureja vs S. tuberosum	49,14	Vs	49,86	0.5581
S. phureja clon C067 vs S. phureja Colombia	49,95	Vs	48,34	0.3435
S. tuberosum Pastusa vs S. tuberosum Tocarreña	45,09	Vs	54,62	<.0001

Los reportes encontrados en literatura a cerca de la capacidad antioxidante FRAP en pollos, hacen mención solo a condiciones de estrés oxidativo por calor o por ascitis, pero se reportan incrementos de la actividad reductora en sangre cuando hay tratamientos contrarrestando el estrés (temperaturas adecuadas y utilización de compuestos antioxidantes) (Rajani *et al.*, 2011 y Lin *et al.*, 2066). Sin embargo se encuentran estudios donde se evalúa el efecto de la adición de compuestos fenólicos para incrementar la cantidad de compuestos antioxidantes (Ácidos protocatequico y vanílico) en sangre (Hamazu y *et al.*, 2010) y al hacer FRAP se encuentra un aumento de esta actividad en un 80%. Estos resultados son similares a los descritos en esta investigación, donde se ha evaluado la cantidad de compuestos fenólicos de papa (Capítulo 2) y al llevar a cabo los contrastes se encuentra que la adición de este alimento en niveles altos de DPPH puede reemplazar la vitamina E, presentando valores más altos de actividad FRAP. La actividad se vio aumentada en un 25%, sin embargo se debe tener en cuenta que los materiales de papa se estudian con el contenido intrínseco de compuestos y no los compuestos aislados.

Otros estudios en alimentos ratifican la actividad antioxidante FRAP en plasma como fuente de compuestos antioxidantes pero en humanos, que plantean el aumento en esta capacidad en un 35% y esto se debe al consumo a corto y largo plazo de los alimentos ricos en antioxidantes como frutas, verduras, vino tinto y el té (Cao *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1998; García *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, se han asociado efectos *in vitro* con los polifenoles antioxidantes que contienen las frutas, como los flavonoides (Hollmann, 2001; Yi-Fang *et al.*, 2002), pero no se ha propuesto una clara demostración *in vivo* de la absorción de los polifenoles y la circulación en plasma por tanto sigue siendo deficiente, sin embargo la prueba de FRAP es una primera aproximación a esa actividad en fluidos biológicos.

En un estudio reportado por Rabovsky en 2006 (Rabovsky *et al.*, 2006) no se presentaron diferencias significativas entre el incremento de la actividad FRAP de un extracto de uvas y vitamina E (10 y 11% respectivamente), al ser suplementados en una dieta para humanos con enfermedades degenerativas, por tanto los resultados obtenidos con papa en nivel medio de DPPH, son similares ya que no se encontraron diferencias estadísticas al ser comparada con vitamina E (5 y 7% respectivamente). La actividad antioxidante con BHT mostro ser mejor a los tratamientos y es confirmado por la actividad antioxidante que demuestra en diferentes publicaciones (Krasowska *et al.*, 2001; Monroy *et al.*, 2009) donde se evidencia el poder antioxidante del BHT en extractos de plantas como el romero (*Rosmarinus officinalis*) y chile (*Capsicum annum*). Sin embargo en un estudio realizado por Rojano en 2008, (Rojano *et al.*, 2008) se analizó la capacidad antioxidante FRAP del isoespintanol, un antioxidante natural fenólico frente a BHT, siendo este último menor que en un 45% de actividad, además la presencia de compuestos fenólicos es evidente, como se evaluó en el capítulo 2, lo que podría ser promisorio frente a esta actividad FRAP ya que los antioxidantes sintéticos como el butil hidroxil tolueno (BHT) tienen un uso restringido en los alimentos y se ha investigado de que sea cancerígeno (Namiki, 1990). De ahí la importancia de la utilización de antioxidantes de origen vegetal ha recibido mucha atención recientemente. Varios extractos de las frutas han sido reconocidos que poseen efectos beneficiosos contra los radicales libres en los sistemas biológicos como antioxidantes naturales (Guo *et al.*, 2003). Muchos estudios han demostrado una correlación entre la ingestión en la dieta de compuestos fenólicos antioxidantes naturales con la disminución en

enfermedad cardíaca coronaria, además de la reducción de mortalidad por cáncer (Halliwell, 2007).

4.2.2 Índice de peroxidación lipídica: Cuantificación de sustancias que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico: TBARS

El índice de peroxidación lipídica se analizó en muestras de carne liofilizada de pechuga y pierna-pernil de pollos de engorde suplementados con antioxidantes y con papa con diferentes niveles de inclusión.

4.2.2.1 TBARS pierna-pernil de pollo

Los resultados indican que la peroxidación lipídica de la carne de pierna-pernil de pollos sin suplementar aumentó en 11.08 mg/g comparado con los grupos suplementados con antioxidantes comerciales o con papa ($P < 0.001$). Indicando que la carne de pollos alimentados sin ningún tipo de antioxidante tiene una mayor susceptibilidad al deterioro lipídico. Dentro de los grupos suplementados se observó que el antioxidante sintético BHT presentó la menor peroxidación lipídica con 15.76 mg MDA/g BS ($P < 0.001$). La vitamina E presentó una menor peroxidación de lípidos al compararla con los materiales de papa ($P < 0.01$). La *S. tuberosum* pastusa y la *S. phureja* Colombia mostraron una menor peroxidación al compararlas con la *S. tuberosum* Tocarreja y *S. phureja* clon C067, respectivamente ($P < 0.001$) (Tabla 4.6).

Tabla 4-6: Contrastes del efecto de la papa sobre TBARS en pierna-pernil de pollo

Contraste				Valor-P
Control vs Resto	42,68	Vs	31,60	< 0,0001
BHT Vs Antioxidantes Naturales	15,76	Vs	37,79	<0,0001
Vit E Vs papa	28,33	Vs	32,80	0,0058
BHT 36 vs papa 36	15,76	Vs	31,50	< 0,0001
BHT 36 vs papa 144	15,76	Vs	33,11	< 0,0001
BHT 36 vs papa 252	15,76	Vs	31,60	< 0,0001
BHT 36 vs papa 360	15,76	Vs	34,98	< 0,0001
Vit E 36 vs papa 36	28,33	Vs	31,50	0.0652
Vit E 36 vs papa 144	28,33	Vs	33,11	0.0072
Vit E 36 vs papa 252	28,33	Vs	31,60	0.0628

Vit E 36 vs papa 360	28,33	Vs	34,98	0,0002
S. phureja vs S. tuberosum	33,10	Vs	32,49	0.0441
S. phureja clon C067 vs S. phureja Colombia	36,60	Vs	29,60	< 0,0001
S. tuberosum Pastusa vs S. tuberosum Tocarreña	28,59	Vs	36,39	< 0,0001

En diferentes estudios se ha planteado que la oxidación lipídica es la causa principal en el desarrollo de sabores rancios y de compuestos tóxicos cancerígenos en los productos cárnicos. La preferencia del consumidor por las carnes con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados se ha aumentado este problema. Durante muchos años, los procesadores de carne han utilizado los antioxidantes sintéticos, como el butil hidroxianisol (BHA) o butilhidroxitolueno (BHT) (Martinez-Tome *et al.*, 2001; Ohshima *et al.*, 1998), para prevenir o reducir el deterioro del sabor, sin embargo, la preocupación por su seguridad y la preferencia del consumidor por alimentos naturales han dado lugar a una gran demanda de aditivos "naturales" que pueden extender la vida útil de productos cárnicos procesados y sin procesar (Brettonnet *et al.*, 2010). En este estudio se evaluó cómo la papa siendo una fuente de compuestos antioxidantes (Capítulo 2) podría reflejar su actividad antioxidante mediante la inhibición de la peroxidación lipídica comparada con BHT y vitamina E en pierna de pollo. Se observó que el BHT constituye la actividad antioxidante más alta dentro de los ingredientes de la dieta teniendo la peroxidación más baja medida como Malondialdehído (MDA) con un resultado de 15.76 mg MDA/g BS.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Hassan en 2005 (Hassan *et al.*, 2005) donde la peroxidación en carne de pollo se vio disminuida en mayor medida por BHT (10 mg MDA/g BS) que por sus tratamientos que eran extractos de las hojas de cocoa (35 mg MDA/g BS) y té verde (30 mg MDA/g BS), fuente de fenoles. Así mismo, los resultados presentados por Selani en 2011 (Selani *et al.*, 2011) son similares en extractos de piel de uva, teniendo un valor más alto en peroxidación con respecto a BHT (120 mg MDA/g BF, 100 mg MDA/g BF). Sin embargo, en diferentes estudios se ha comprobado la influencia de compuestos polifenólicos en la peroxidación lipídica en carne por encima de compuestos sintéticos antioxidantes como BHA y BHT (Jayathilakan *et al.*, 1997; Lee y Ahn, 2005; Naveena *et al.*, 2008; Sáyago *et al.*, 2009; Teets y Were, 2008; Vasavada y Cornforth, 2006). Probablemente la papa al estar completa y no en extracto (donde sus compuestos antioxidantes están más disponibles) no presente una actividad más alta que BHT, pero al

ser comparada con vitamina E solo se presentan diferencias significativas en cantidades de inclusión superiores con respecto a su actividad DPPH (36 y 144), lo cual es promisorio ya que la vitamina E es muy utilizada en dietas porque mejora la estabilidad oxidativa de los productos de carne cruda y precocida de pollos de engorde durante el almacenamiento refrigerado (Sheehy *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 1998; O'Neill *et al.*, 1998;) pero tiene un alto costo, por lo tanto, la papa podría usarse como alternativa viable frente a la vitamina E. Estos resultados están de acuerdo a los reportados por Botsoglou en 2002 (Botsoglou *et al.*, 2002) donde se presenta un estudio con aceite esencial de orégano, presentando una disminución de la peroxidación en pierna de pollo frente a vitamina E. Con respecto a las diferencias mostradas entre materiales de papa, no se muestran resultados en literatura con referencia a la inclusión de papa en una dieta antioxidante para pollos de engorde, siendo este estudio el primero con esta matriz.

4.2.2.2 TBARS pechuga de pollo

Los resultados muestran que el tratamiento control sin suplementar presentó 5.71 mg MDA /g BS más peroxidación lipídica comparada con los demás grupos experimentales. El efecto del antioxidante sintético BHT fue mejor que el de la vitamina E y la papa en todos los niveles de DPPH, resultado esperado ya se trata de un antioxidantes puro. Sin embargo al comparar Vitamina E con los diferentes niveles de papa la peroxidación lipídica fue similar excepto en el nivel 360 donde se observó una mayor peroxidación en papa (4.15 mg MDA/g). En promedio los materiales de papa *S. phureja* comparados con los de *S. tuberosum* presentaron 0.7 mg MDA/g más peroxidación ($P < 0.01$). Dentro de las *S. phureja* la menor peroxidación la presentó el grupo suplementado con *S. phureja* Colombia (3.17 mg/g) y dentro de las *S. tuberosum* la menor peroxidación fue para el grupo *S. tuberosum* Tocarreña (3.14 mg/g) (Tabla 4.7).

Tabla 4-7: Contrastes del efecto de la papa sobre TBARS en pechuga de pollo

Contraste				Valor-P
Control vs resto	9,35	Vs	3,64	< 0,0001
BHT Vs papa	1,45	Vs	3,66	<0,0001
Vit E Vs papa	3,34	Vs	3,66	0.2958

BHT 36 vs papa 36	1,45	Vs	3,21	< 0,0001
BHT 36vs papa 144	1,45	Vs	3,95	< 0,0001
BHT 36 vs papa 252	1,45	Vs	3,33	< 0,0001
BHT 36 vs papa 360	1,45	Vs	4,15	< 0,0001
Vit E 36 vs papa 36	3,34	Vs	3,17	0,6556
Vit E 36 vs papa 144	3,34	Vs	4,46	0,1514
Vit E 36 vs papa 252	3,34	Vs	3,14	0,9731
Vit E 36 vs papa 360	3,34	Vs	4,15	0,0059
S. phureja vs S. tuberosum	3,52	Vs	3,8	0,0069
S. phureja clon C067 vs S. phureja Colombia	3,87	Vs	3,17	0,0095
S. tuberosum Pastusa vs S. tuberosum Tocarreña	4,46	Vs	3,14	< 0,0001

Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Jung en 2010 (Jung *et al.*, 2010) donde los tratamientos (mezclas en diferentes proporciones con ácido gálico) fueron mejores que el control (23 mg MDA/g BF, 29 mg MDA/g BF respectivamente), presentando diferencias significativas ($P < 0,005$) en pechuga. El tratamiento con BHT fue mayor con respecto a todos los tratamientos, este resultado fue similar al presentado por Selani en 2011 (Selani *et al.*, 2011), donde uno de sus tratamiento con extractos de uvas fue mayor en peroxidación lipídica que BHT en carne de pollo (120 mg MDA/g BF y 100 mg MDA/g BF respectivamente), sin embargo este antioxidante sintético se ha ido reemplazando por el uso de antioxidantes de origen natural como vitamina E o α -tocoferol que a través de diferentes estudios ha demostrado su potencial en la prevención de la peroxidación lipídica (Tang *et al.*, 2001). En otro estudio tres extractos de canela de diferentes orígenes comerciales mostraron una actividad antioxidante similar a la de BHT (Kamel, 1999).

Aparte de α -tocoferol, existen antioxidantes naturales en la dieta como los extractos de romero (López-Bote *et al.*, 1998) que también han demostrado tener el potencial de aumentar la capacidad antioxidante de la carne de pollo. El aceite esencial del orégano en la dieta mejora la estabilidad oxidativa de la carne de pollo cruda o precocida durante el almacenamiento refrigerado (Botsoglou *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003; Botsoglou *et al.* 2004). Los suplementos dietarios con plantas y extractos de plantas son una estrategia simple y conveniente al querer introducir un antioxidante natural en la carne de pollo. Alternativas de antioxidantes naturales también han sido evaluadas como un suplemento dietético para los pavos. El efecto de aceite esencial del orégano y la suplementación con

acetato de tocoferol en la susceptibilidad de la carne de pavo cruda y cocida frente a la oxidación de lípidos durante el almacenamiento refrigerado y en la oxidación lipídica inducida por el hierro ha sido determinado por Botsoglou en varias investigaciones (Botsoglou *et al.*, 2002a; Botsoglou *et al.*, 2002b; Botsoglou *et al.*, 2003a; Botsoglou *et al.*, 2003b; Botsoglou *et al.*, 2003c; Papageorgiou *et al.*, 2003) donde los valores de peroxidación con aceites esenciales oscilan entre 150 y 400 ng MDA/g BF. La inclusión de 200 mg de aceite de orégano/kg en la dieta fue más eficaz para retrasar la oxidación lipídica en comparación con la inclusión de 100 mg/kg, pero equivalente a la inclusión de 200 mg/kg α -Tocoferol acetato. Marcincak en 2008 (Marcincak *et al.*, 2008) demostró que la adición de aceite esencial del orégano en la dieta de pollos de engorde era eficaz para retrasar la oxidación lipídica en comparación con la dieta control. Así mismo, la actividad antioxidante de algunas plantas como extracto de romero, extracto de hoja de olivo, extractos de té ha sido comprobada (Scheeder, 2000).

El efecto antioxidante de la papa en distintas inclusiones no tuvo diferencias significativas frente a vitamina E, lo cual podría ser por la presencia de compuestos antioxidantes de tipo fenólico, como el ácido clorogénico, que podría inhibir la peroxidación ya que se plantea que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en las plantas se debe principalmente a sus propiedades redox y la estructura química. En una investigación Farag en 1989 (Farag *et al.*, 1989), examinó la relación entre la propiedad antioxidante y la composición química de los aceites esenciales y se sugirió que la alta actividad antioxidante de compuestos como el timol se debe a la presencia de grupos OH fenólicos que actúan como donantes de hidrógeno a los radicales peroxilos producidos durante el primer paso en la oxidación de lípidos. Teissedre y Waterhouse, en 2000 (Teissedre y Waterhouse, 2000) reportaron una alta correlación (-0,78) entre el contenido de fenoles totales de aceites esenciales y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad *in vitro*.

La carne de pierna de pollo tuvo una mayor cantidad de MDA por tanto tiene una mayor susceptibilidad a la oxidación, lo cual se explica por el mayor contenido absoluto de los ácidos grasos poliinsaturados en el músculo (Jensen *et al.*, 1997), cantidad de sustratos fácilmente oxidables, el alto nivel de pro-oxidantes procedentes de la mioglobina y otras proteínas que contienen hierro en el músculo del muslo es otro factor que puede conducir a una menor estabilidad oxidativa en el músculo del muslo que en la pechuga.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio la papa podría usarse como fuente de antioxidantes naturales y conservar ácidos grasos como omega 3 y 6 en la carne de pollo. Se resalta que desde hace varias décadas los procesadores de alimentos y los productores se enfrentan al reto de aumentar el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la dieta sin necesidad de modificaciones sustanciales en los hábitos alimentarios (Ackman y Ratnayake, 1990).

4.3 Conclusiones

En la actividad FRAP los materiales de papa adicionados en mayor proporción son comparables con la actividad presentada por BHT en un 90% y fue similar a vitamina E

Entre los materiales de papa evaluados para FRAP el mejor fue las comerciales (Tocarreña) 13%

El pierna de pollo con papa no tuvo efecto inhibir significativamente la peroxidación.

En pechuga, la peroxidación lipídica presentada por la papa en un nivel de inclusión medio fue mejor en un 10%

Entre los materiales de papa evaluados para TBARs en pechuga, se destaca tuberosum comercial (Tocarreña), superior en 5%

5 Conclusiones y recomendaciones generales

5.1 Conclusiones

El mejor clon de papa fue el CO56 siendo superior a papa criolla comercial en ácido ascórbico, (46%), ácido clorogénico (48%) y fenoles totales (39%) y su capacidad antioxidante ABTS (16%) , FRAP(43%) DPPH (37%) y ORAC (35%)

El tratamiento con el clon de papa CO56 tiene un potente efecto protector contra el estrés oxidativo y el daño hepático agudo inducido por CCl₄ en ratas Wistar, al reducir el daño hepático agudo comparado con Silimarina

En la actividad FRAP los materiales de papa adicionados en mayor proporción son comparables con la actividad presentada por BHT en un 90% y podría reemplazar la suplementación con vitamina E

En pechuga, la peroxidación lipídica presentada por la papa en un nivel de inclusión medio fue mejor en un 10% y podría reemplazar la inclusión de vitamina E.

5.2 Recomendaciones

Hacer el análisis de antocianinas en los clones de papa ya que estos compuestos se caracterizan por tener una actividad antioxidante importante y tener más información que permita atribuir la actividad a un grupo de compuestos.

Hacer el bioensayo en pollos de engorde con el Clon CO56 con el fin de analizar si se tiene el mismo efecto antioxidante que en ratas.

Hacer ensayos de la biodisponibilidad y los mecanismos de acción de los componentes bioactivos de la papa y también su eficacia en el tratamiento y post-tratamiento de patologías relacionadas con el estrés oxidativo.

Hacer seguimiento morfoagronómico al clon CO56.

Bibliografía

Ackman R, Ratnayake W. Chemical and analytical aspects of assuring an effective supply of omega-3 fatty acids to the consumer. In: Lees R., Karel M. (eds): Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease. Marcel Dekker, New York and Basel 1990; 215–233.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105(1): 1211-26.

Ahn JH, Grun IV, Fernando LN. Antioxidant properties of natural plants extract containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science* 2002; 67:1364-1368.

Al-Jaber N, Awaad A, Moses J. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. 2011. *Journal of Saudi Chemical Society.* 15, 293–307

Allard JP, Kurian R, Aghdassi E, Muggli R, Royall D. Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids* 1997 May; 32 (5):535-41.

Al-Weshahy Amir, Rao Venket. Isolation and characterization of functional components from peel samples of six potatoes varieties growing in Ontario. *Food Research International* 2009; 42:1062-1066.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:7915-22.

André C. Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 2009.

Andre CM, Ghislain M, Bertin P, Oufir M, Herrera Model R, Hoffmann L, et al. Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55 (2):366-378.

Andre CM, Oufir M, Guignard C, Hoffmann L, Hausman J-F, Evers D, Larondelle Y. Antioxidant profiling of native Andean potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) reveals cultivars with high levels of b-carotene, a-tocopherol, chlorogenic acid, and petanin. *J. Agr. Food Chem* 2007 55:10839-10849.

Ariza-Nieto M, Burgos G, Bonierbale M, Rutzke M, Welch R, Glahn R. In vitro Fe bioavailability in Potato (*Solanum tuberosum*). *The FASEB Journal.* 2008;21:858.3.

Armstrong D. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int. J Cancer* 1975; 5 (4):617-631.

Baltacioglu E, Akalin FA, Alver A, Deger O, Karabulut E. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology* 2008; 53:716.

Beckman JS, Koppenal WH. Nitric oxide superoxide, and peroxinitrite- the good, the bad, and the ugly- *Am. J Physiol* 1996; 40:C1424-37.

Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-76

Berner IA, O`donnell JA. Funcional fodd and health claims legistalion: aplications to dairy food. *Int Dairy J.* 1988; 8 (5/6):355-362.

Berry MN, Halls HJ, Grivell MB. Techniques for the pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspension. *Life Sciences* 1992; 51:213-218.

Botsoglou NA, Christaki E, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Spais AB. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Sci.* 2002; 62:259-265.

Botsoglou NA, Christaki E, Florou-Paneri P, Giannenas I, Papageorgiou G, Spais AB. The effect of amixture of herbal essential oils or-tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 2004; 34:52-61.

Botsoglou NA, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and -tocopheryl acetate supplementation. *Food Res. Intern.* 2003; 36:207-213.

Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris DJ, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br. Poult. Sci.* 2002; 43:223-230.

Botsoglou NA, Govaris A, Botsoglou E, Grigoropoulo SH, Papageorgiou G. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and -tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51:2930-2936.

Botsoglou NA, Grigoropoulo SH, Botsoglou E, Govaris A, Papageorgiou G. The effects of dietary oregano essential oil and -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Sci.* 2003; 65:1193-1200.

Bourre JM. Where to find omega-3-fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3-fatty acids to increase nutritional value derived products for human: what is actually useful? *Journal of Nutrition, Health and Aging* 2005; 9:232-242.

Bradford, MM. *Anal. Biochem* 1976; 72:248-254.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 1995; 28:25-30.

Brettonnet A, Hewavitarana A, DeJong S, Lanar M. Phenolic acids composition and antioxidant activity of canola extracts in cooked beef, chicken and pork. *Food Chemistry* 2010; 121:927-933.

Brown CR, Culley D, Bonierbale M, Amorós W. Anthocyanin, carotenoid content, and antioxidant values in native South American Potato Cultivars. *HortScience* 2007; 42:1733-1736.

Burgos G, Auqui S, Amoros W, Salas E, Bonierbale M. Ascorbic acid concentration of native Andean potato varieties as affected by environment, cooking and storage. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009.

Burgos G, Salas E, Amoros W, Auqui M, Muñoa L, Kimura M, Bonierbale M. Total and individual carotenoid profiles in *Solanum phureja* of cultivated potatoes: I. Concentrations and relationships as determined by spectrophotometry and HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009.

Burlingame B, Mouille B, Charrondiere R. Nutrients, bioactive non-nutrients and antinutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009; 22:494-502.

Buzby JC, Hodan OF. Chicken Consumption Continues Long Run Rise. USDA, ERS, Amber Waves, Findings 2006; 4 (2):5. ERS Best Diet and Health Finding in Amber Waves.

Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1997; 58:79-110.

Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 68:1081-87.

Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *Journal of Nutrition* 1998; 128:2383-2390.

Cheesman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1998; 49: 481-93.

Christensen R, Marcussen AB, Wortwein G, Knudsen GM, Aznar S. Abeta (1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels. *Exp. Neurol.* 2008; 210:164-171.

Chun OK, D-O Kim, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agric.* 2005; 85:1715-1724.

Clydesdale F. Funcional Foods: Opportunities & Challenges. *Food Technology* 2004; 58 (12):35-40.

Davies BH. Carotenoids in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Ed. Goodwin, T. W., Vol. 2, p. 38, Academic Press, London 1976.

Degirmenchi I, Kalender S, Ustuner MC, Kalender Y, Gunes HV, Unal N, Basaran A. The effects of acarbose and *Rumex patientia* on liver ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic (type-II) rats. *Drugs Exp. Clin. Res.* 2002; 28:229-34.

Díaz-Acosta A. Membrillo-Hernández J. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonización en diversos sistemas biológicos. *Revista especializada de Ciencias Químico – Biológicas* 2006; 9 (1):34-44.

Diplock A. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:S189-93.

Eichhorn S, Winterhalter P. Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Research International* 2005; 38:943-948.

El-Weshahy A, Venket Rao A. Isolation and characterization of functional components from peel samples of six potatoes varieties growing in Ontario. *Food Research International* 2009.

Espinal C, Martínez H, Pinzón N, Barrios C. La cadena de la papa en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Observatorio Agrocadenas, Colombia 1991-2005. <http://www.agrocadenas.gov.co>

Eposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med* 2000; 28 (5):754-766.

Lagarde M. Docosahexaenoic acid: Nutrient and precursor of bioactive lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2008; 110:673-678.

Farag RS, Badei AZM, Hewedi FM, El-Baroty GSA. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1989; 66:792-799.

Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López JA. "Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat" *Food Chemistry* 1997; 59:343-53.

Fernández-Pachón MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. "Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition" *Analytica Chimica* 2004; Acta 513:113-18.

Foti MC, Dasquino C, Geraci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcohol solutions. *Journal of Organic Chemistry* 2004; 69:2309-14.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P. Oxidative damage to DNA during aging. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:4533-7.

Frankel EN, Meyer AS. Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80:1925-41.

García-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara M, Periamo MJ. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research* 2006; 26:330-339.

Garella S. The cost of dialysis in the USA. *Nephrol. Dial. Transplant* 1997; 12:10-2.

Gómez R. Guía para las Caracterizaciones Morfológicas Básicas en Colecciones de Papas Nativas. Germoplasma de Papa, Depto. de Mejoramiento y Recursos Genéticos, Centro Internacional de la Papa. En: <http://www.neiker.net/neiker/papasalud/Materials/INIAP%20Caracterizacion%20Morfologica%20PapasOK.pdf>

Gordon MH. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: BJJ Hudson (Ed.). *Food antioxidants Elsevier Applied Science London* 1990; 1-18.

Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 2003; 23: 1719-1726.

Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219:1-14.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford 1997.

Halliwell B. The antioxidant paradox. *The Lancet* 2000; 355:1179-84.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Mol. Aspects Med.* 1985; 8:89-193.

Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am. J. Med.* 1991; **91** (Sup 3C), 14S.

Hamauzu Y, Takedachi N, Miyasaka R, Makabe H. Heat treatment of Chinese quince polyphenols increases rat plasma levels of protocatechuic and vanillic acids. *Food Chemistry* 2010; 118:757-763.

Hargis PS, Van Elswyk ME. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. *Worlds Poultry Sci.* 1993; J49:252-264.

Hassan O, Fan L, The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM) *LWT* 2005; 38:315-321.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13:572-84.

Hirose M, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S, Kato T, Shirai T. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either

alone or in combination and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 1998; 19:2072-12.

Hollmann PCH. Evidence for health benefits of plant phenols: Local or systemic effects? *Journal of Science Food and Agriculture* 2001; 81:842-852.

Hsun-Lang Fanga, Wen-Chuan Lin. Corn oil enhancing hepatic lipid peroxidation induced by CCl₄ does not aggravate liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46 (6):2267-2273.

Ivor JB, Schneider MD. Learning from failure: congestive heart failure in the postgenomic age. Review series introduction. *J Clin Invest* 2005; 115:495-9.

Iwanzik W, Tevini M, Stute R, Hilbert R. Carotenoid content and composition of different potato varieties and their importance for the color of the flesh of the tuber. *Potato Research* 1983; 26:149-162.

Jayathilakan H, Vasundhara T, Kumudavally K. Effect of spices and Maillard reaction products on rancidity development in precooked refrigerated meat. *Journal of Food Science and Technology* 1997; 34:128-131.

Jensen C, Skibsted LH, Jakobsen K, Bertelsen G. Supplementation of broiler diets with all-rac-alpha- or a mixture of natural source RRR-alpha-,gamma-,delta-tocopheryl acetate. 2. Effect on the oxidative stability of raw and precooked broiler meat products. *Poult Sci.* 1995; 74 (12):2048-56.

Jensen C, Lauridsen C, Bertelsen G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. *Trends Food Sci. Tech.* 1998; 9:62-72.

Jensen CJ, Guidera I, Skovgaard H, Staun and Skibsted L. Effects of dietary 3-tocopheryl acetate supplementation on 3-tocopherol deposition in porcine m. psoas major and m. longissimus dorsi and on drip loss. Color stability of pork meat. *Meat Sci.* 1997; 45:491-500.

Jin L, Xue H, Jin LJ, Li S, Xu YP. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Pharmacology* 2008; 582 (1-3): 162-167.

Jin Z, Yang YX, Choi JY, Shinde PL, Yoon SY, Hahn T-W, Lim HT, Park YK, Hahm KS, Joo JW, Chae BJ. Effects of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) protein having antimicrobial activity on the growth performance, and intestinal microflora and morphology in weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 2008; 140:139-154.

Johnston DE, Kroening C. Mechanism of early carbon tetrachloride toxicity in cultured rat hepatocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 1998; 39:231.

Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cal J. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2000; 28 (4): 625-35.

Jung S, Choe J, Kim B, Yun H, Kruk Z, Jo C. Effect of dietary mixture of gallic acid and linoleic acid on antioxidative potential and quality of breast meat from broilers. *Meat Science* 2010; 86:520-526.

Junqueira O. Impacto de la Nutrición de Pollos de Engorde en el Medio Ambiente. Facultad de Ciencias Agraria y Veterinarias. UNESP 2005. Jaboticabal, São Paulo. Brasil. Disponible en la página web www.engormix.com.

Kamel C. Novel tools to test new feed additives. *Feed International* 1999; 20 (8):22-26.

Kanel GC, Korula J. *Atlas of Liver Pathology*. Edinburgh, UK: Elsevier Saunders 2005.

Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Inhibition of both stage I and stage II skin tumor promotion in SENCAR mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea: Inhibition depends on the duration of polyphenols treatment. *Carcinogenesis* 1993; 14 (12):2642-2643.

Khan M, Siddique F. Antioxidant effects of *Citharexylum spinosum* in CCl₄ induced nephrotoxicity in rat. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2010; 10:1016.

Khan MR, Ahmed D. Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. *Food Chem Toxicol* 2009; 47:1393-1399.

Khan MR, Rizvi W, Khan GN, Khian RA and Shaheen S. Carbon tetrachloride induced nephrotoxicity in rat: Protective role of *Digera muricata*. *J. Ethnopharmacol* 2009; 122: 91-99.

Khan RA, Khan MR, Sahreen S, Bokhari J. Prevention of CCl₄-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48:2469-2476.

Khan RA, Khan MR, Sahreen S, Bokhari J. Prevention of CCl₄- induced nephrotoxicity with *Sonchus arvensis* in rat. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 10:1016.

Kimura M, Kobori CK, Rodriguez-Amaya DB, Nestel P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chem* 2007; 100:1734-1746.

Klaassen CD, Watkins JB. *Pharmacol. Rev.* 1984; 36:1-67.

Krasowska A, Rosiak D, Szkapiak K, Oswiecimska M, Witek S, Lukaszewicz M. The antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA and PPA measured by chemiluminescence. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2001; 6:71-81.

Kumar G, Banu GS, Pandian MR. Evaluation of the antioxidant activity of *Trianthema portulacastrum* L. *Ind J Pharmacol* 2005; 37:331-3.

L.F. Ospina. Comprobación de la actividad hipoglicémica y captadora de Radicales Libres Oxigenados de los Principios Activos de *Curatella americana*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia 1995.

- Lachman J. The influence of flesh colour and growing locality on polyphenolic content and antioxidant activity in potatoes. *Scientia Horticulturae* 2008; 117:109-114.
- Lachman J, Hamouz K, Orsák M, Pivec V, Dvořák P. The influence of flesh colour and growing locality on polyphenolic content and antioxidant activity in potatoes. *Scientia Horticulturae* 2008; 117:109-114.
- Lachman J, Hamouz K, Orsak M, Pivec V, Dvorak P. The influence of flesh colour and growing locality on polyphenolic content and antioxidant activity in potatoes. *Scientia Horticulturae* 2008b; 117(2):109-114.
- Landrum J, Bone R. Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 385 (1):28-40.
- Lee E., Ahn A. Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extract. *Meat Science* 2005; 71:300-305.
- Leri Francesca, Innocenti M, Andrenelli L, Vecchio V, Mulinacci N. Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolic acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and correlations with variety and geographical origin. *Food Chemistry* 2001; 125:750-759.
- Lin CC, Yen MH, Lo TS, Lin JM. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activity of *Boehmeria nivea* var. *nivea* and *B. nivea* var. *tenacissima*. *J. Ethnopharmacol* 1998; 60:9–17.
- Lin H., Decuyper E, BuyseAcute J. Heat stress induces oxidative stress in broiler chickens *Comparative Biochemistry and Physiology* 2006; Part A 144:11-17.
- Lopez-bote C, Gray J, Gomaa E, Flegal C. *Br. Poult. Sci.* 1998; 39:57-61.
- Love SL, Salaiz T, Mosley AR, Thornton RE. Stability of expression and concentration of ascorbic acid in North American potato germplasm. *HortScience* 2004 39:156-160.
- Maraschiello C. Cholesterol Oxidation and parameters related to lipid oxidation in raw and cooked meat from broilers fed dietary oils and fat, natural antioxidants and prooxidants. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona 1998.
- Marcincak S, Cabadaj R, Popelka P, Soltysovag L. Antioxidative effect of orégano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat. *Slov. Vet. Med.* 2008; 45:61-66.
- Martínez-Tome M, Jimenez, A, Ruggieri S, Frega N, Strabbioli R, Murcia M. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection* 2001; 64:1412-1419.
- Mattila P, Hellström J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis* 2007; 2(3–4):152-160.

McGeachin RB, Srinivasan LJ, Bailey CA. Comparison of the effectiveness of the two antioxidants in the broiler type diet. *J. Appl. Poult. Res.* 1992; 1:355-359. (*Nutr. Abst. Rev.* 1993; 63:492).

Mielnick MB, Olsen E, Vogt G, Adeline D, Skrede G. Grape seedextract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT Food Science and Technology* 2006; 39:191-198.

Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 1993; 84:407-12.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. MADR. Cadena papa 2007.

Mitra SK, Venkataranganna MV, Sundaram R, Gopumadhavan S, Effect of HD-03, a herbal formulation, on the antioxidant defense system in rats. *Phytotherapy Research* 1998; 12:114-117.

Molan AL, MA Lila, Mawson J. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. *Food Chemistry* 2008; 107(3):1039-1044.

Monroy A, Garcia I, Totosaus A. Evaluación de antioxidante y antimicrobiana de extractos etanolicos de romero y chile ancho y su aplicación en un batido cárnico. *Nacameh* 2009; 3 (1):21-32.

Mora A, Ospina LF. Evaluación del efecto de los frutos de *physalis peruviana* sobre el estrés oxidativo en un modelo de diabetes experimental. Tesis de Maestría. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia 2009.

Mueller BA, Talbert RL. Biological mechanisms and cardiovascular effects of omega-3 fatty acids. *Clinical Pharmacy* 1988; 7:795-807.

Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1990; 29:273-280.

Naqui A, Britton C, Cadenas E. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 1996; 55:137-66.

Nara K, Miyoshi T, Honma T, Koga H. Antioxidative activity of bound-form phenolics in potato peel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2006; 70:1489-1491.

Navarre DA, Goyer A, Shakya R. Nutritional Value of Potatoes: Vitamin, Phytonutrient, and Mineral Content. USDA-ARS, Washington State University, 24106 North Bunn Road, Prosser, WA, 99350, USA. 2009.

Navarre DA, Pillai S, Shakya R, Holden MJ. HPLC profiling of phenolics in diverse potato genotypes. *Food Chemistry* 2011; 127:34-41.

NFS. The Review of Fertilizer Year 2002. National Fertilizer Secretariat Ministry of Agriculture and Livestock, Sri Lanka. 2002; 75 p.

Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄-induced liver injury in low-protein fed rats. *Phytotherapy Research* 2005; 19:341–345.

Ohshima T, Yankah VV, Ushio H, Kiozumi C. Antioxidizing potentials of BHA, BHT, TBHQ, tocopherol, and oxygen absorber incorporated in Ghanaian fermented fish product. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1998; 434:181-188.

O'Neill LM, Galvin K, Morrissey PA, Buckley DJ. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meta and meta products. *Br. Poultry Sci.* 1998; 61:8-12.

Ou B, Hampsch- Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49:4619-26.

Papageorgiou G, Botsoglou NA, Govaris A, Giannenas I, Iliadis S, Botsoglou E. Effect of dietary oregano oil and α -tocopheryl acetate on ironinduced lipid oxidation of turkey meat breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2003; 87:324-332.

Paynter J. Changes in activity of the manganese superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary manganese. *J Nutr.* 1980; 110 (3):437-447.

Penarrieta M, Salluca T, Tejada L, Alvarado JA, Bergenståhl B. Changes in phenolic antioxidants during chuno production (traditional Andean freeze and sun-dried potato). *Journal of Food Composition and Analysis* 2011; 24 (4-5):580-587.

Pihlanto A, et al. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry* 2008; 109:104-112.

Pin-Der-Duh X. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* linne): Its scavenging effect on free radical and active oxygen. *J. Am. oil Chem. Soc.* 1998; 75:455-461.

Pin-Der-Duh X, Pin-Chan-Du X, Gow-Chin Yen X. Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 1999; 37:1055-1061.

Pokorny J. Natural antioxidant for food use. *Trends Food Sci. Technol.* 1991; 9:223-227.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53 (10):4290-4302.

Priscilla DH, Prince PSM. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem. Biol. Inter.* 2009; 179:118-124.

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000; 48:3396-3402.

Rabovsky A, Cuomo J, Eich N. Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects. *Clinica Chimica* 2006; *Acta* 37155-60.

Rajani J, Karimi MA, Torshizi SH, Rahimi, Control of ascites mortality and improved performance and meat shelf-life in broilers using feed adjuncts with presumed antioxidant activity. *Animal Feed Science and Technology* 2011; 170 (3-4):239-245.

Ramachandran B, Ravi K, Narayanan V, Kandaswamy M, Subramanian S. Effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on tissue defense system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica* 2004; *Acta* 345:141-150.

Rechnagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1989 ;43:139-54.

Rodriguez De Sotillo D, Hadley M, Holm ET. Phenolics in aqueous potato pell extract: Extraction, identification and degradation. *Journal of Food Science* 1994; 59(3):649-651.

Rodriguez-Amaya DB. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington DC: ILSI Press 2001.

Rojano B, Gaviria C, Gil M, Saenz J, Schinella G, Tournier H. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica*. ISSN 0121-4004 Volumen 15 número 1, año 2008. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 173-181

Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J, Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106 (Supplement 5).

Rostagno H. *Tabelas brasileiras para aves e suínos*. Viçosa (MG). Universidade Federal de Viçosa 2005.

Rumbaoa R. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009.

Saura-Calixto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry* 2006; 94:442-47.

Sàyago-Ayerdi S., Brenes A, Viveros A, Goñi I. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Science* 2009; 83:528-533.

Scheeder MRL. Internal research report. Institute of Animal Science. Nutritionbiologie. ETH-Zürich, Switzerland 2000.

Selani M, Contreras-Castillo C, Shirahigue L, Gallo C, Plata-Oviedo M, Montes-Villanueva N. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Science* 2011; 88:397-403.

- Shahidi F, Miraliakbari H. Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part 1 - Cardiovascular disease and cancer. *Journal of Medicinal Food* 2004; 7:387-401.
- Sheehy PJA, Morrissey PA, Flynn A. Influence of heated vegetable oils and -tocopheryl acetate supplementation on -tocopherol, fatty acids and lipid peroxidation in chicken muscle. *Br. Poult. Sci.* 1993; 34:367-381.
- Sheweita SA. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr. Drug. Metab.* 2000; 1:107-132.
- Silva E, Verdalet I. Alimentos e ingredientes derivados de la leche, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2003; 53 (4); 1-24.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1991; 54:438-463.
- Singh N, Kamath V, Narasimhamurthy K, Rajini PS. Protective effect of potato peel extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008; 26 (2):241-246.
- Singh, N, Rajini PS. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry* 2004; 85(4): 611-616.
- Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids- A structure-activity relationship study. *Free Radical Research* 2006; 40:433-42.
- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.
- Smith D, Roddick J, Jones L. Synergism between the potato glycoalkaloids a-chaconine and a-solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry* 2001; 57:229-234.
- Sosulski F, Krygier K, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1982; 30 (2):337-340.
- Souza MF, Rao VSN, Silveira ER. Inhibition of lipid peroxidation by ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa* L. *Phytomedicine* 1997; 4:25-9.
- Sundari P, Wilfred G, Banumathi R. Does oxidative protein damage play a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride-induced liver injury in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1997; 1362 (2-3):169-176.
- Szopa J, Wilczyński G, Fiehn O, Wenczel A, Willmitzer L. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*Solanum tuberosum*) by GC-MS. *Phytochemistry* 2001; 58:315-320.
- Tanaka M, Kuie CW, Nagashima Y, Taguchi T. Applications of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; 54:1409-1414.

Tang S, Kerry JP, Sheehan D, Buckley DJ, Morrissey PA. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International* 2001; 34:651-657.

Teets AS, Were LM. Inhibition of lipid oxidation in refrigerated and frozen salted raw minced chicken breasts with electron beam irradiated almond skin powder. *Meat Science* 2008; 80:1326-1332.

Thompson M, Thompson H, McGinley J, Neil E, Rush D, Holm G, Stushnoff C. Functional food characteristics of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.): Phytochemical composition and inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced breast cancer in rats 2009; 22 (6):571-576.

Ugochukwu NH, Babady NE, Cobourne N, Gasset SR. The effect of *Gongronema latifolium* extracts on serum lipid profile and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *Journal of Biosciences* 2003; 28:1-5.

Vasavada M, Cornforth D. Evaluation of antioxidant effects of raisin paste in cooked ground beef, pork, and chicken. *Journal of Food Science* 2006; 71:242-246.

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. "Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro" *Analytica Chimica Acta* 2005; 538:391-98.

Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 2003; 33:105-136.

Wendel A, Feuerstein S, Konz KH. Acute paracetamol intoxication in starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 28:56.

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; S13:17-29.

Xu WT, Zhang FF, Luo YB, Ma LY, Kou XH, Huang KL. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydr. Res.* 2009; 344:217-222.

Yi-Fang, C, Jie S., Xianzhong W, Rui HL. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50:6910-6916.

Zia-ur-R, Farzana H. Shah Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. *Food Chemistry* 2004; 85:215-220.

Zwart L. Biomarkers of free radical damage application in experimental animals and in humans. *Free Rad. Med. Biol.* 1999; 26 (7):202-226.