

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Efectos hipolipémico y antioxidante de *Lepidium  
meyenii* Walp en ratas**

**TESIS**

para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**AUTOR**

María Raquel Oré Sifuentes

**ASESOR**

Libertad Alzamora Gonzáles

**Lima – Perú**

**2008**

## RESUMEN

La maca (*Lepidium meyenii Walp*) es una raíz de los andes del Perú, usada como alimento por su valor nutricional y sus propiedades etnomedicinales, por lo que forma parte de la medicina tradicional.

Los objetivos del presente estudio fueron, demostrar la capacidad antioxidante de los extractos acuoso y etanólico de harina de maca amarilla *in vitro* y comprobar en animales que recibieron una dieta hipercolesterolémica el efecto antioxidante e hipolipemiante de los ecotipos amarillo, negro, rojo y morado de maca. Finalmente evaluar los efectos adversos de la administración de maca y atorvastatina en ratas hipercolesterolémicas a nivel hepático.

Se realizaron pruebas para medir la capacidad antioxidante del extracto acuoso y etanólico *in vitro*.

Se emplearon ratas machos Sprague-Dowley, sometidas a una dieta rica en colesterol y distribuidas en grupos de acuerdo al tratamiento, ya sea con los ecotipos de maca o atorvastatina, se evaluó perfil lipídico, vitamina A, C, niveles de TBARS-MDA y fibrinógeno. Los cuales fueron analizados aplicando la prueba t de Student y la Turkey. Así mismo mediante cortes histológicos se evaluó el tejido aórtico y hepático de los grupos de estudio.

El extracto acuoso de harina de maca amarilla mostró mayor capacidad antioxidante que el etanólico probablemente debido a la presencia de fenoles y flavonoides.

En los animales hipercolesterolémicos, la administración de maca ejerció un mayor efecto protector contra el daño oxidativo al disminuir los niveles de TBARS- MDA en un 67.7% e incrementar los valores de la vitamina C en un 87.7% respecto al control positivo. En estos animales, la administración de maca redujo los niveles de colesterol, LDL<sub>c</sub> y triglicéridos ( $p < 0.05$ ) respecto al control positivo. También la maca causó una disminución de los niveles de fibrinógeno, el que está relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis.

Al evaluar los efectos adversos de la administración de atorvastatina y de harina de maca mediante enzimas marcadoras de daño hepático y cortes histológicos, se demostró que la maca produjo menor daño hepático que la atorvastatina, que es usada como uno de los mejores agentes hipolipemiantes en la clínica médica para el tratamiento de dislipidemias.

La harina de maca amarilla presentó una mayor capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, probablemente debido a la presencia de fenoles y flavonoides. Así mismo la maca amarilla produjo

efectos benéficos sobre el perfil lipídico lo cual se demostró en los cortes de tejido aórtico donde se observó un menor daño endotelial.

**Palabras claves:** Daño oxidativo, Radicales libres, Maca, DPPH, Hipercolesterolemia, Fibrinógeno, TBARS-MDA, *Lepidium meyenii* Walp, Actividad antioxidante, Efecto hipolipemiente.

## ABSTRACT

The "maca" (*Lepidium meyenii Walp*) is an andean root from Peru, used as a food for its nutritional value and ethnomedical properties, being part of peruvian traditional medicine.

The goals of this study were to demonstrate *in vitro* the antioxidant capacity of aqueous and ethanolic extracts from yellow maca flour and verify the antioxidant and hypolipemic effect of ecotypes yellow, black, red and purple of maca over animals that were fed with a hypercholesterolemic diet. Finally, evaluate the unfavorable effect of maca and atorvastatin administration in hypercholesterolemic rats at hepatic level.

Tests were performed to measure *in vitro* the antioxidant capacity of aqueous and ethanol extracts.

Sprague-Dowley male rats were used, subjected to a rich-cholesterol diet and distributed in groups according to various treatments, either with different ecotypes of maca or atorvastatin. Lipid profile, vitamins A and C, TBARS-MDA and fibrinogen were measured and statistically analyzed by Student's t-test and Tukey. Likewise, through histologic sections the aortic and hepatic tissues from study groups were evaluated.

The aqueous extract from yellow maca flour showed higher antioxidant capacity than the ethanolic extract and this capacity is probably due to the presence of phenols and flavonoids.

In the hypercholesterolemic animals, administration of maca exerted a larger protective effect against oxidative damage, diminishing TBARS-MDA levels in 67.6% and increasing vitamin C values in 87.7% with respect to positive control. In this animals, administration of maca decreased cholesterol, LDL<sub>c</sub> and triglycerides levels ( $p < 0.05$ ) with respect to positive control. Maca, as well, caused a decreasing in fibrinogen level, which is related to atherosclerosis development.

Evaluating the harmful effects of atorvastatin and maca flour administration through markers of liver damage, such as enzymes, and histologic sections, it was demonstrated that maca caused less liver damage than atorvastatin, which is used as one of the best hypolipemic agents in clinical medicine for dyslipidemias.

Yellow maca flour showed larger *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity, probably due to presence of phenols and flavonoids. In addition, the yellow maca exhibited benefit probably due to its effect over lipid profile, showing less endothelial damage in the aortic tissue sections.

**Key words:** Oxidative damage, Free radicals, Hipercolesterolemia, , Maca, DPPH, Fibrinogen, TBARS-MDA, *Lepidium meyenii* Walp, Antioxidant capacity, Hypolipemic effect.

## ABREVIATURAS

RL	Radicales libres
EOR	Especies reactivas del oxígeno
$1O_2$	Oxígeno singulete
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
.OH	Hidroxilo
$O_2^-$	anión superóxido
$HO_2^{\cdot}$	radical hidroperóxido
GSSG	Glutaion oxidado
GSH	Glutation reducido
DPPH	1,1 difenil-2-picrilhidracil
TRAP	Potencial antioxidante total
MDA	Malodialdehido
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
AA	Acido ascórbico
FC	Folln Ciocalteu
Nm	nanómetros
IC <sub>50</sub>	Concentración del 50% de la Capacidad máxima de captar RL
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS-MDA	Complejo reactivo tiobarbitúrico- malondialdehido
HMG-CoA R	Hidroximetil Glutaril CoA reductasa
ALT	alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotrasferasa
CK	Creatincinasa
PAL	Fosfatasa alcalina
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferasa
CETP	Proteínas trasferidoras de colesterol
TGO	Transaminasa Glutamato Oxalacetato
TGP	Transaminasa Glutámico Pirúvica
GGT	y Glutamil transferasa

# INTRODUCCIÓN

La respiración en presencia de oxígeno resulta esencial en la vida celular de nuestro organismo, el hombre consume unos 17 litros de oxígeno diariamente, de los cuales alrededor del 2-5% producen moléculas reactivas, conocidas como radicales libres **(RL)**. Una paradoja en el metabolismo es que mientras la gran mayoría de organismos requiere del oxígeno para su existencia, el oxígeno es una molécula altamente reactiva que, daña a los seres vivos produciendo especies reactivas del oxígeno **(ERO)** que ocasionan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud por su capacidad de alterar el DNA (los genes), las proteínas, los lípidos y carbohidratos. Los RL son átomos o grupos de átomos inestables, muy reactivos y son producto de la **OXIGENACIÓN CELULAR**.

Los RL, se tornan sumamente activos puesto que el electrón impar o solitario "busca desesperadamente una pareja" para salir del desequilibrio atómico. Para lograr su objetivo, sustrae un electrón a cualquier molécula vecina, lo que en química quiere decir que "oxida" la molécula, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre "ansioso" por captar un electrón. Se genera así una reacción en cadena. Para poder estabilizarse a sí mismo, el radical libre buscará y "robará" un electrón a una molécula sana y estable, buscando completar su propia configuración.

Hay varios tipos de RL: superóxidos, hidróxidos y peróxidos. Las ERO presentan una alta reactividad, tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares, conociendo que sus blancos fundamentales son los ácidos grasos insaturados de las membranas biológicas, las proteínas y los ácidos nucleicos (DNA). (Zorrilla y Col., 2004). Lo primero que ataca los RL son las membranas de las células provocando peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

La peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados de las membranas biológicas puede producir:

1. Incremento de la rigidez de la membrana.

2. Disminución de la actividad de enzimas ligadas a membranas.
3. Alteración de la actividad de receptores de membrana.
4. Alteración de la permeabilidad de la membrana.

Los procesos metabólicos normales en los organismos que utilizan oxígeno pueden producir especies reactivas del oxígeno (**ERO**) como:  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ , entre otros.

Quizás la fuente endógena más importante generadora de EROS es la cadena respiratoria mitocondrial, aunque también pueden incluirse algunas reacciones del metabolismo de los prostanoides, la autooxidación de las catecolaminas, la actividad de la xantina oxidasa y la activación de fagocitos y células endoteliales (Ríos de Molina, 2003) .

Para contrarrestar el efecto perjudicial de los radicales libres y las EROS, los organismos vivos han desarrollado un complejo sistema de defensa antioxidante que incluye enzimas (Superóxido dismutasa, catalasa, glutathion transferasa, glutathion peroxidasa) y distintas moléculas de origen tanto endógeno como exógeno. Dentro de este último grupo se encuentra aquellos compuestos antioxidantes que son aportados por la dieta y entre los que destacan las vitaminas C y E (tocoferol), los carotenoides y los flavonoides.

Los tocoferoles tienen la capacidad para proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y a la oxidación de la LDL, que han sido involucradas en la formación de placas ateromatosas que son responsables de problemas cardio y cerebrovasculares. Su acción está vinculada con la reducción de enfermedades cardiovasculares y prevención del cáncer (Lee y Col., 2004). La investigación de la vitamina E sobre la prevención de la peroxidación de lípidos, condujo a la identificación de antioxidantes como agentes reductores, que depuran las EROS antes de que puedan dañar las células (Wolf, 2005).

El licopeno, es un potentísimo antioxidante que pertenece a la familia de los carotenoides, componente al cual deben su coloración roja los tomates. Con propiedades similares a los  $\beta$  carotenos de las zanahorias,

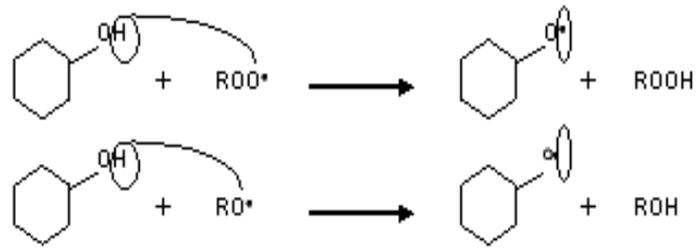
tiene propiedades anticancerígenas. El licopeno parece reducir las probabilidades de cáncer de próstata, pulmón, estómago, vejiga, estómago y cuello del útero. Tiene además las propiedades de disminuir el colesterol en la sangre e incrementar los niveles de HDL (Zapata y Col.; 2007).

Recientemente se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes: los compuestos fenólicos. Algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y aceitunas (polifenoles). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto, té verde y té negro. Por esta razón, la forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del daño oxidativo producido por los RL es el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras moléculas que tienen función antioxidante, tales como los compuestos fenólicos. Estos vegetales poseen propiedades antioxidantes que en varios casos son mucho más poderosas que las vitaminas ya mencionadas.

Tradicionalmente, los compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de los vegetales, fueron considerados antinutrientes, debido al efecto negativo de uno de ellos, como es el caso de los taninos sobre la digestibilidad de las proteínas. Sin embargo, en la actualidad, se demostró que en particular, uno de los subgrupos: los flavonoides, presentan actividades antioxidantes ya que son excelentes dadores de electrones o hidrógeno con la formación de radicales intermedios relativamente estables.

Este comportamiento está relacionado con la capacidad de quelar metales, la potente actividad antioxidante de estos compuestos (Agostini y Col., 2004) reside en sus estructuras químicas con un grupo o-difenólico, un doble enlace conjugado 2-3 y grupos hidroxilos en posiciones 3 y 5 (Bravo, 1998), lo que los torna muy eficientes contra radicales hidroxilo y peroxilo.

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilos que contienen en su estructura (Figura A).



**Figura A.** Actividad antioxidante de los polifenoles.  
(Fernández- Pachón y Col., 2004).

Son numerosos los estudios epidemiológicos que relacionan el consumo elevado de alimentos de origen vegetal, ricos en estos compuestos, con una menor incidencia de enfermedades relacionadas con procesos de oxidación (Diabetes mellitus, aterosclerosis, hipertensión, cáncer, problemas cardiovasculares, entre otros) (Pineda y Col., 1999).

Cuando se produce un desbalance entre la producción de oxidantes (RL) y antioxidantes, estamos en presencia del estado conocido como **estrés oxidativo**, donde los RL son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, y consecuentemente, llegar a producir daño celular y distintas patologías.

El estrés oxidativo es una condición en la que las sustancias oxidantes tienen predominio sobre la defensa antioxidante del organismo humano. Los compuestos oxidantes son los radicales RL que químicamente corresponden a moléculas que tienen uno o más electrones desapareados, hecho que los torna en compuestos de elevada reactividad por la necesidad de aparear su electrón. Diversas evidencias muestran que el estrés oxidativo contribuye con el proceso de envejecimiento y con la patogénesis de enfermedades crónicas como cáncer, Diabetes mellitus, aterosclerosis, etc.

En la mayoría de los países occidentales, la aterosclerosis es la enfermedad más frecuente y la causa principal de muerte, representando el doble de las muertes por cáncer y 10 veces más que por accidentes. A pesar de los significativos avances médicos, la enfermedad de las arterias coronarias (que es producida por la aterosclerosis y causa infartos) y el

ictus aterosclerótico son responsables de más fallecimientos que todas las demás causas juntas.

La aterosclerosis (Hansson GK, 2005) es una enfermedad de evolución crónica, caracterizada por la formación de placas de tejido fibroso y elementos lipídicos con el concurso de la adherencia plaquetaria en el endotelio de las arterias. La placa aterosclerótica va obstruyendo paulatinamente los vasos hasta producir insuficiencia del riego sanguíneo en dichas arterias. Esta obstrucción puede ser parcial o completa. Se cree que la aterosclerosis comienza cuando la capa íntima de las arterias es dañada, ocasionando pérdidas de las células de la superficie endotelial y ocasionando la proliferación de las células del músculo liso subyacente y la acumulación de lípidos séricos y con posterior formación de estrías grasas.

Esta proliferación celular, clave en la aterogénesis, es estimulada por procesos inflamatorios y también por el incremento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los factores de crecimiento derivados de las plaquetas. La aterosclerosis está íntimamente ligada a problemas cardio y cerebro vasculares.

La aterosclerosis es una enfermedad de origen multifactorial con gran dependencia genética y susceptible de agravarse según el estilo de vida y la influencia que el medio ambiente ejerza sobre la persona.

Algunos factores tienen una relación causa-efecto muy estrecha con la aterosclerosis, porque actúan directamente en el incremento de su progresión y gravedad. A estos se les ha denominado factores de riesgo ateroscleróticos y los principales son la dislipidemia, la hipertensión, la Diabetes, el tabaquismo y la obesidad.

El colesterol total y LDL (Low-density proteins) colesterol elevados constituyen los principales determinantes reconocidos de la enfermedad cardiovascular (ECV) (Van Oostrom, y Col., 2004 y Assmann, G, Nofer JR 2002), sin embargo existen evidencias no convincentes de que la vitamina E, carotenoides y vitamina C protegen contra la enfermedades ECV;

diversos estudios han demostrado que los flavonoides y otros polifenoles con importantes propiedades antioxidantes presentes en los vegetales y pueden proteger al organismo de las ECV.

La eficacia de la terapia con vitaminas antioxidantes ha sido evaluada por estudios o pruebas al azar los cuales mostraron que no existe una clara reducción de la mortalidad por ECV con la suplementación con dichas vitaminas, aún cuando ésta se prolongue hasta seis años o más (Rapola y Col., 1997 y Olmedilla y Col., 2001).

La vitamina E ha recibido mayor atención en los estudios epidemiológicos realizados. En gran parte de estos estudios se ha encontrado asociación negativa entre mortalidad por cardiopatía isquémica y los niveles promedio de vitamina E en el plasma. Se ha encontrado, además, asociación entre niveles muy bajos de vitamina C plasmática y una alta mortalidad por enfermedades cardiovasculares y se informa una mayor mortalidad por isquemia en regiones donde el consumo de vitamina C es relativamente bajo (Pita y Col., 2007).

El tratamiento ideal para la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia, es el uso de fármacos (estatinas) que inhiban la enzima **HIDROXIMETIL GLUTARIL CoA REDUCTASA (HMG CoA REDUCTASA)**.

Actualmente se favorece la búsqueda de nuevas drogas hipocolesterolémicas a partir de un mejor conocimiento del metabolismo y transporte de las lipoproteínas, una de las más estudiadas e investigadas son las estatinas.

Las estatinas también se denominan «inhibidores de la HMG-CoA reductasa», esta enzima controla la síntesis de colesterol endógeno. Las estatinas ayudan a bloquear esta enzima, lo cual hace que el organismo produzca menos colesterol. Cuando se retarda la producción de colesterol, el hígado comienza a producir más receptores de LDL. Estos receptores capturan las LDL, reduciendo así la cantidad de colesterol LDL en la corriente sanguínea. Los niveles reducidos de LDL pueden dar lugar a niveles más bajos de triglicéridos y niveles más elevados de colesterol HDL.

Estos fármacos constituyen actualmente la monoterapia más eficaz para disminuir los niveles de colesterol plasmático. La atorvastatina y la rosuvastatina son los fármacos más potentes disponibles en el mercado, alcanzando reducciones de hasta 60% en los niveles de colesterol LDL con respecto a los valores pre-tratamiento. Además de la actividad hipocolesterolémica, las estatinas inducen una amplia gama de efectos pleiotrópicos extralipídicos que contribuirían significativamente a su acción protectora cardiovascular (Topol EJ, 2004 y Larosa JC y Col., 2005).

De hecho, algunos estudios han indicado que la reducción en los niveles de colesterol LDL no explica completamente la mejor evolución de los pacientes que fueron tratados intensamente con estatinas, sugiriendo la contribución de los efectos antiinflamatorios de esta clase de medicamentos (Davignon y Col., 2004).

Un estudio realizado por MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) (Schwartz y Col., 2001) han demostrado que la terapia intensiva con atorvastatina 80 mg/día iniciada precozmente después de un síndrome coronario agudo, redujo en 16% la aparición de nuevos eventos cardiovasculares a 16 semanas de seguimiento, comparado con un grupo placebo. Este efecto protector cardiovascular se asoció con una reducción del colesterol LDL plasmático desde 124 hasta 72 mg/dl. Este tipo de estudios, asociado al análisis de protocolos clínicos, llevaron a plantear la hipótesis que mientras más se reducen los niveles de colesterol LDL se podría obtener una mayor protección cardiovascular.

Aun siendo muy sugerente, este planteamiento fue discutido y hasta hace poco tiempo carecía de evidencia derivada de grandes estudios clínicos prospectivos que lo sustentara más sólidamente.

En protocolos clínicos más recientes, esta hipótesis "mientras más se reduce el colesterol LDL es mejor", se ha ido validando hasta establecerse categóricamente.

La terapia intensiva con estatinas en dosis altas, que logra niveles de colesterol hasta el rango de 70-80 mg/día, tiene un impacto beneficioso

adicional con respecto al uso de estatinas en dosis bajas, reduciendo la progresión de las lesiones ateromatosas y mejorando la evolución clínica de la enfermedad isquémica.

Numerosos estudios (Blanco-Colio y Col., 2004, Schmermund A y Col., 2006 y Martín -Ventura y Col., 2006) han demostrado el efecto de las estatinas y que posiblemente su mecanismo de acción en el desarrollo de la aterosclerosis sería a nivel de 4 eventos:

1. En el proceso inflamatorio de la pared endotelial.
2. En la proliferación de la células musculares lisas que migran hacia la capa subendotelial de los grandes vasos.
3. En la trombogénesis.
4. En la inestabilidad de las placas ateromatosas.

El perfil de seguridad de las estatinas es favorable, aunque se han observado algunos efectos secundarios serios pero son limitados los datos de seguridad a largo plazo. Los dos principales efectos adversos observados hasta la fecha son **hepatotoxicidad y miopatía.**

En conjunto, las elevaciones de transaminasas 3 veces superiores al límite superior de lo normal suceden en aproximadamente el 1 % de los pacientes, son ligeramente más frecuentes a dosificaciones máximas y suceden generalmente en los 12 primeros meses. Parecen normalizarse al suspender la administración de fármacos, y suelen presentarse de forma asintomática, por lo que es necesaria una vigilancia periódica de enzimas hepáticas

Dependiente de la dosis usada y tiempo de tratamiento, puede causar hepatotoxicidad con una elevación de las enzimas marcadoras de daño hepático: alanina aminotransferasa (ALT) llamado también transaminasa glutámico Oxaloacética (TGO) y la aspartato animotransferasa (AST) conocida también como transaminasa glutámico pirúvico (TGP) y miopatías (incluye una gama de síntomas musculares y marcadores séricos elevados de lesión muscular tales como creatincinasa (CK), AST y la aldolasa.

También se puede usar otros tipos de drogas para reducir los niveles plasmáticos de LDL como los secuestrantes de ácidos biliares (resinas), ácido nicotínico (niacina), derivados del ácido fíbrico (fibratos), inhibidores de la absorción del colesterol, etc. sin embargo, las estatinas son las más usadas a pesar de que pueden ocasionar efectos adversos.

Estudios previos realizados por Oré y Col., (2001), demostraron que la vitamina E en animales hipercolesterolémicos, ejerce un papel protector sobre la peroxidación lipídica sérica y en tejido aórtico, aun cuando no mejora el perfil lipídico.

En el año 2004, Oré y Col., publicaron una investigación sobre el efecto de la maca como agente hipolipemiante comparado con el efecto de la atorvastatina en animales hipercolesterolémicos, evaluándose enzimas marcadoras de daño hepático como las transaminasas y gamma-glutamil transferasa (GGT), encontrándose diferencia significativa entre el control positivo y el grupo que recibió la estatina en las transaminasas y de la enzima gamma-glutamil transferasa. También mostró que los niveles de albúmina sérica y bilirrubina se incrementaron como consecuencia de una disminución de la capacidad funcional del tejido hepático.

En busca de alternativas terapéuticas para el tratamiento de las dislipidemias que es la principal causa de la aterosclerosis y de problemas cardiovasculares, se realizan investigaciones con plantas que tengan principios activos con efecto hipolipemiante.

Una de las plantas usadas como hipolipemiante es la caigua, que reduce la LDL e impide que esta lipoproteína sea oxidada e inicie la formación de las estrías grasas, también eleva la HDL, sin embargo en animales de experimentación si el tratamiento es largo puede causar oxidación del LDL que fácilmente atravesaría el endotelio y produciría proliferación de las células musculares lisas conllevando el inicio de la formación de la línea grasa.

Según González, G (2006), en estudios realizados en la Universidad Cayetano Heredia a un grupo de 60 personas, distribuidas en 6 grupos,

durante 12 semanas se les administró caigua (cápsulas), causando una reducción del colesterol (18,3%), de la LDL (23%) y de HDL en un 42%. Asimismo, redujo también los niveles de triglicéridos. Sin embargo, se conoce que la administración de caigua en ratas no favorece la disponibilidad de vitamina A, que es utilizada para la visión nocturna.

El aceite de linaza (fuente de ácidos grasos omega 3) fue investigada en dos estudios y encontraron reducción de la LDL, tal vez reduce ligeramente la hipertensión y hace más lenta la aterosclerosis (Bahram y Col., 1998).

Las preparaciones de ajo han mostrado hacer más lento el desarrollo de la aterosclerosis en los vasos sanguíneos de ratas, conejos y seres humanos, reduciendo el tamaño de los depósitos de placa en casi el 50%.

Además, en un estudio doble ciego controlado por placebo, que se administró polvo estandarizado de ajo en una dosis de 900 mg por día, a 152 individuos durante 4 años, mostró desarrollo lento de las placas ateromatosas cuando se midió por ultrasonido la elasticidad de las arterias. (Koscielny y Col., 1999 y Breithaupt-Grogler y Col., 1997).

Muchas hierbas y suplementos parecen disminuir la adherencia de las plaquetas, incluyendo arándanos, matricaria, jengibre, ginkgo, policosanol y espino blanco. Si esto se traduce en un beneficio real para la prevención de la aterosclerosis es algo que permanece desconocido.

Diversos estudios epidemiológicos apoyan la relación entre el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos, como el *Zea mays L*, y una baja incidencia de enfermedad cardíaca coronaria, aterosclerosis y ciertas formas de infarto y cáncer (Pedreschi y Col., 2007 y Cooke y Col., 2005).

Recientemente, se ha reportado que estos alimentos tienen actividad antioxidante y pueden mejorar los perfiles lipídicos en modelos experimentales (Xia y Col., 2006 y AViram y Col., 2004).

En la actualidad se están realizando numerosos estudios científicos en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria alimenticia, cosmética y en la atención de la salud para la prevención y/o cura de diversas enfermedades. Los antioxidantes naturales hallados especialmente en plantas son las vitamina E, A, C y otros metabolitos como resveratol, flavonoides, taninos, Se, Cu y Zn (García y Col., 2001).

La búsqueda de nuevos antioxidantes naturales podría llevar a identificar y aislar estructuras químicas con efectos terapéuticos mayores que las conocidas, o que operen por mecanismos novedosos. El descubrimiento de que ciertos antioxidantes conocidos se encuentran en especies vegetales en las que se ignoraba su presencia, incrementaría el valor económico de tales plantas y podría convertirlas en alternativas más viables que las actuales para obtener los compuestos. Ello daría mayor justificación a los esfuerzos por conservar no sólo a las plantas sino a los ecosistemas a los que pertenecen.

*Lepidium meyenii* Walp (maca) es un cultivo tradicional de los andes centrales Peruanos. Está adaptada a condiciones ecológicas muy frías donde otro cultivar no podría prosperar, estas zonas se caracterizan por tener temperaturas promedio entre 4 y 7° C, alta irradiación solar, heladas frecuentes, vientos fuertes y suelos ácido (pH<5) (Obregón y Col., 2006).

Es consumido desde tiempos ancestrales como parte de la dieta, pero también se le ha atribuido propiedades medicinales por lo que forma parte de nuestra medicina tradicional.

En los últimos 40 años se han desarrollado un gran número de investigaciones a nivel nacional e internacional acerca de sus propiedades farmacológicas y fitoquímicos.

Investigadores peruanos han demostrado que tiene propiedades nutricionales, sobre la fertilidad en los habitantes de las grandes alturas donde la fertilidad está alterada, espermatogénesis y actividad antioxidante (González, G. 2006 y Sandoval y Col., 2002 ).

Los contenidos nutricionales y funciones farmacológicas de la maca son diferentes de acuerdo a los colores de los ecotipos (Marin, 2002 y McCollom, y Col.; 2005). Se ha reportado la existencia de ocho o más ecotipos de acuerdo a los colores de su hipocótilo (Rea, 1994).

La maca roja tiene alto contenido de proteína y potasio, y bajo contenido de azúcares solubles, riboflavina y hierro en comparación con la maca negra.

Estudios realizados por diferentes investigadores llegan a la conclusión que los tres ecotipos de maca presentan diferentes actividades biológicas. Dentro de las propiedades medicinales también se menciona su capacidad de reducir los efectos del estrés y la fatiga; aún cuando los mecanismos no han sido dilucidados, se ha propuesto que la maca es un adaptógeno, aumentando la energía, la resistencia y reduciendo el estrés (Lopez-Fando, A y Col., 2004; Rubio, J. y Col., 2007, Sandoval, M. y Col., 2002 y Balick, M.; Lee, R. 2002).

A fin de contribuir en la investigación de esta especie nativa peruana, poder darle un valor agregado y favorecer su biocomercio como alimento funcional y/o nutraceutico que pueda ser usado en la prevención de enfermedades crónicas como la Diabetes mellitus, cáncer, problemas cardiovasculares, aterosclerosis, dislipidemias entre otras.

Por estas razones, la presente investigación consideró plantear los siguientes objetivos:

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Determinar el efecto hipolipemiente y antioxidante de *Lepidium meyenii* *Walp* en animales hipercolesterolémicos.

## 2. Objetivos Específicos

- Realizar la extracción e identificación de la capacidad antioxidante de extractos de raíces del ecotipo amarillo de *L. meyenii Walp.*
- Demostrar la capacidad antioxidante de harina de raíces de *L. meyenii Walp* en animales hipercolesterolémicos.
- Demostrar la actividad hipolipemiante de de harina de raíces de *L. meyenii Walp* en animales hipercolesterolémicos y comparar su efecto con una estatina (Atorvastatina).
- Demostrar que la administración de de harina de raíces de *L. meyenii Walp* es inocua para el tejido hepático en comparación con atorvastatina en animales hipercolesterolémicos.
- Establecer una correlación anátomo-patológica de marcadores bioquímicos con la evaluación del tejido hepático.
- Proponer un posible mecanismo de *L. meyenii Walp* como agente hipolipemiante.

## ANTECEDENTES

*Lepidium meyenii* Walp. (maca) es una planta que crece en las alturas de los andes Peruanos, en los ecosistemas de Suni y Puna de los departamentos de Junín y Cerro de Pasco, y a altitudes que oscilan desde 3500 hasta 4500 msnm. Conocida y utilizada desde tiempos precolombinos principalmente como una planta medicinal y/o alimenticia, la medicina tradicional peruana hace mención de sus principales propiedades como estimulante de la reproducción y energizante (Antunez de Mayolo, 1977).

Los primeros estudios fitoquímicos en raíces de maca, fueron realizados por Chacón en 1961, en extractos de acetona, éter sulfúrico y alcohol encontrando 4 tipos de alcaloides a los que denominó macaina, pero no halló ningún tipo de alcaloide en extracto acuoso.

La primera descripción de la composición química de maca deshidratada variedad amarilla (Junín) reporta 35.51% de humedad y 10.30 g% de proteína (Baquerizo, 1968).

Estudios realizados por Johns 1981, reportan la presencia de metabolitos secundarios como los glucosinolatos, que se transforma en isotiocianatos y que investigaciones posteriores demostraron que tiene actividad pro-apoptótica y antiproliferativa (Fahey y Col., 2001).

Yllescas (1994), realizó un estudio fitoquímico de tres ecotipos de raíces de maca (amarilla, roja y negra) de la zona de Carhuamayo, Junín. Aisló tres alcaloides, un flavonoide, esteroides, compuestos fenólicos cumarinas, taninos, triterpenos, glucósidos, saponinas, aminoácidos libres, aminos secundarias alifáticas y aminos terciarias. También determinó micronutrientes y compuestos nutritivos, entre ellos fructosa, que es el nutriente de los espermatozoides.

## Composición química bromatológica de tres ecotipos de maca

<b>Determinación</b>	<b>Amarillo</b>	<b>Rojo</b>	<b>Negro</b>
<b>Análisis proximal</b>	<b>(g%)</b>	<b>(g%)</b>	<b>(g%)</b>
Humedad	9.71	10.14	10.47
Proteínas totales	17.99	17.22	16.31
Grasa	0.82	0.91	0.82
Fibra	5.30	5.45	4.95
Cenizas	3.49	3.68	3.63
Carbohidratos	62.69	62.60	63.82
Nitrógeno total	2.87	2.76	2.42
Nitrógeno no proteico	1.55	1.16	1.36
Proteína pura	8.25	9.97	7.70
<b>Carbohidratos</b>			
Almidón	37.86	37.52	38.18
Azúcares solubles	6.17	6.03	7.02
Reductores directos			
Azúcares solubles	16.17	17.26	17.10
Reductores indirectos			
<b>Vitaminas (mg%)</b>			
Niacina	43.03	37.27	39.06
Ácido ascórbico	3.52	3.01	2.05
Riboflavina	0.61	0.50	0.76
Tiamina	0.42	0.52	0.43
<b>Sales Minerales (mg%)</b>			
Potasio	1130	1160	1000
Sodio	20	20	40
Magnesio	70	80	80
Calcio	190	200	240
Fósforo	320	290	280
<b>Oligoelementos (p.p.m)</b>			
Cobre	6	6	8
Zinc	32	30	30
Manganeso	22	20	22
Hierro	80	62	82
Boro	12	24	26

Se ha reportado en la revista Food Chemistry un estudio acerca de la composición química de la maca, realizada en la Universidad de Nápoles y Salerno en Italia, utilizando raíces de maca del Perú obtenidas de la cosecha de 1990 (Dini y Col., 1994). Es conocida la deficiencia de aminoácidos esenciales en los tubérculos y raíces, sin embargo en el caso de la maca presenta cantidades adecuadas de aminoácidos esenciales, excepto triptofano.

Dini y Col., 1994, publicaron una descripción más completa de la composición de maca deshidratada: 10.2% de proteínas, 59% de carbohidratos, 2.2% de lípidos, 8.5% de fibra. Igualmente hallaron la presencia de ácidos grasos libres, como ácidos linoleico, palmítico y oleico. Los ácidos grasos insaturados representan un 52.7% mientras los ácidos grasos saturados están presentes en el 40.1%.

Recientemente, estudios realizados por Muhammad y Col., 2002, sobre la composición química de la maca, reportaron la presencia de macamida y macaenos, se ha propuesto que son compuestos con actividad biológica involucradas en incrementar el comportamiento sexual. El contenido de estos compuestos varía ampliamente en diferentes tipos de muestras de maca (Wang y Col., 2007).

Estudios realizados por Torres (2003), demostraron que la administración acuosa de maca a ratones no era tóxica. El extracto acuoso de maca posee un DL 50 mayor a 12000mg/Kg de peso, en ninguno de los animales se observó cambios en su comportamiento, la típica "marcha hacia atrás" o sus pelos erizados, estos comportamientos son indicadores de una reacción tóxica letal.

La maca puede tener una baja toxicidad en algunos sistemas biológicos (Valerio y Gonzales, 2005), por ejemplo cuando se utiliza aceite de maca (100 µg/ml) puede ser tóxico para una cianobacteria. Muchos investigadores no concuerdan con esta opinión. Se ha reportado que usualmente la gente consume maca alrededor de 50-100 g de maca seca por cada comida (0.71-1.42 g de raíz seca por Kg de peso) (Chung y Col., 2005).

Sin embargo, la administración oral de maca a ratas hasta dosis altas, equivalente a 10 veces la dosis administrada a humanos, no produjo cambios significativos en el peso del cuerpo y órganos respecto a los controles (Chung y Col., 2005 y Gonzales y Col., 2006). Estos resultados muestran que la maca no produce toxicidad en animales.

Estudios realizados en la Pontificia Universidad Católica del Perú por Castillo y Lock (2005) sobre compuestos con actividad antioxidante en extracto etanólico de maca, demostraron la presencia de 7 compuestos, siendo el ácido 2-hidroxicafeico el de mayor actividad antioxidante, que es superior al de la quercetina y rutina (flavonoides) que se utilizan como estándares.

Investigaciones realizadas por Gonzales y Col., (2005-2006) encontraron que la maca presenta actividad anti-proliferativa. El mecanismo de esta función puede deberse a que

1. La maca tiene la capacidad de eliminar los radicales libres, y mejorar la citoprotección bajo condiciones de daño oxidativo (Lee y Col., 2005). Investigaciones recientes, reportan que la maca elimina ERO/ERN y de esa manera ayudaría a proteger a las células de cambios patológicos.
2. Muchos estudios han mostrado que el consumo de este tipo de vegetales (crucíferas) reducen el riesgo de muchos tipos de cáncer. La actividad quimioprotectora de estos vegetales puede deberse a la presencia de glucosinolatos y sus derivados (Fahey y Col., 2001). El contenido de glucosinolatos en maca fresca es cerca del 1%, el cual es 100 veces mayor que en otras raíces de crucíferas.
3. La presencia de alcaloides y de esteroides en maca puede también contribuir a la actividad anticancerígena. Estudios realizados por Lagarda y Col., 2006, Zheng y Col., 2000 reportan que los fitoesteroides tienen actividad anticancerígena .

No existen estudios que indiquen diferencias en los metabolitos secundarios entre ecotipos de maca. estudios realizados por Gonzales G., (2006) utilizando espectroscopia infrarrojo (permite la identificación de grupos químicos funcionales) hallaron diferencias en los picos de absorbancia entre 3 ecotipos de maca: negra, amarilla y roja, así como las diferentes concentraciones de glucosinolatos en los tres muestras.

En una serie de estudios científicos describen propiedades como la cura de impotencia (Ahmed, 2003), aumento de hormonas sexuales (Willard, 2000), tratamiento de síntomas menstruales y de la menopausia (Willard, 2000), energizante y revitalizadora (Piacente y Col., 2002); como antioxidante en peces (Lee y Col., 2005), con propiedades nutricionales en ratas y peces (Canales y Col. 2000; Torres, 2003 y Lee y Col. 2004). Otros metabolitos secundarios importantes son las fitoalexinas que contienen azufre y otras carentes de azufre, estas últimas son capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas humanas y pueden ser usadas como agentes quimiopreventivos (Pedras y Col., 2000).

Se realizaron estudios en un modelo animal para comprobar la capacidad que tiene la maca, para recuperar la calcemia y se obtuvieron resultados positivos cuando se administró una dieta con maca amarilla al 20% por peso de dieta, durante 30 días (Munaylla, S., 2003).

La administración de extracto acuoso de maca amarilla a ratas ovariectomizadas, incrementó significativamente el peso del útero y la mejora de los ductos en las mamas (Oré y Col., 2007).

El ecotipo que se consume más es amarillo, probablemente debido a su cocción y sabor agradable. Los principales centros de comercialización de maca están en la Oroya, Junín y Huancayo. La poca aceptación para el consumo de maca, puede deberse a su aroma y sabor, pero también influye la falta de costumbre y difusión en la elaboración de comidas y bebidas (Torres, 1984 y León, 1964).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## I. MUESTRA BIOLÓGICA

Las raíces del ecotipo amarillo de maca, *Lepidium meyenii* Walp, procedieron de la localidad de Carhuamayo, en la meseta de Junín cerca de Cerro de Pasco. Se colectaron entre Junio y Agosto del año 2000 (Figura 1, 2, 3, 4).

## II. HABITAT

La maca se cultiva entre 3500 hasta 4800 msnm; el departamento de Junín, se encuentra ubicado entre los 4100-4450 msnm en el piso ecológico de la Puna donde la radiación solar es alta, las heladas son frecuentes y predominan vientos fuertes.

## III. ESTUDIO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO

### 1. Procesamiento de la harina de maca y preparación del extracto acuoso y etanolico

**a.** Se utilizaron raíces de maca de 5 a 7 cm de diámetro, enteras, fueron limpiadas y se eliminaron las raicillas, luego se lavaron para eliminar detritus y otros elementos extraños. Se cortaron en delgados pedazos, se dejaron sobre unas bandejas, y se secaron en una estufa de aire circulante entre 37 a 40°C durante 48 horas. Durante el secado los trozos de maca fueron removidos por lo menos tres al día para garantizar un secado homogéneo, hasta que el peso se mantuviera constante.

**b.** Los trocitos secos fueron molidos en un molino marca Retsch K3 N° 5 (Figura 5 y 6), luego se tamizaron hasta obtener un polvo fino que se conservaron en recipientes de plástico sellados herméticamente para evitar la contaminación microbiana.

**c. Preparación del extracto etanólico.** Se pesaron 100 gramos de la maca pulverizada (Figura 7) y se añadió 500 ml de etanol al 70% (V/V). Se dejó en maceración durante 7 días, mezclando diariamente durante 3 minutos.

Se filtro el extracto, primero a través de gasa, posteriormente al vacío a baja presión, empleando un embudo de Buchner al que se le colocó un papel de filtro Watman N° 1, obteniéndose un líquido de color ámbar. El extracto fue colocado en placas petri grandes. Se colocaron las placas petri con el filtrado en una estufa de aire circulante a 40°C durante 5 días. Posteriormente se pesó lo recuperado y fue guardado en frascos de color ámbar en un desecador en refrigeración a 4°C hasta su uso. Posteriormente se midió la capacidad antioxidante: poder reductor ( $H_2O_2$ ), la presencia de fenoles totales y flavonoides, actividad antirradical empleando el método del DPPH (Figura 9).

**d. Preparación de la muestra acuosa.** Se pesaron 30 gramos de polvo de maca y se añadió 60 ml de agua destilada, posteriormente se sometió a hervido durante 10 minutos, con el objeto de validar la preparación que realizan las personas de la región alto-andina, que la consumen como parte de su dieta. Para las determinaciones *in Vitro*, el extracto acuoso fue filtrado a través de gasa y luego usando un papel de filtro Whatman N° 1, se obtuvo un filtrado de color caramelo (50 mg/ml). También se preparó un extracto acuoso sin hervir (50 mg/ml), se dejó la muestra durante toda la noche, posteriormente fue filtrado a través de gasa y papel de filtro Whatman N° 1, obteniéndose un filtrado de color caramelo. Todos los ensayos para medir la capacidad antioxidante se llevaron a cabo con una solución de maca fresca (Figura 8 y 10).

**2. Evaluación de la actividad captadora de radicales libres método del DPPH.** Se midió aplicando el método descrito por Yamaguchi y Col., 1998, con algunas modificaciones. El extracto etanólico de maca (50 mg/ml) fue disuelto en etanol a una concentración de 20mg/ml. Antes de iniciar la reacción se preparó una solución metabólica de DPPH (100µM).

En una cubeta de 1 ml se colocó 500µl de maca y se adicionó 500µl de DPPH. La disminución de la absorbancia fue leída a 517 nm en un espectrofotómetro Genesys -2. La capacidad de captación de radicales de los extractos fue expresado como % de inhibición y fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ de Inhibición} = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

Donde  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia en el tiempo cero.

$A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra a los 15 minutos.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se promediaron las lecturas. Con estos datos se determinó la  $CE_{50}$  (concentración eficiente para obtener el 50% de la capacidad máxima para captar radicales libres). El ácido ascórbico y el trolox fueron usados como estándares.

**3. Determinación de la capacidad reductora total.** Se determinó por el método de Oyaizu (1986), se mezcló 0.5 ml del extracto original (40-80µg/ml) se mezcló con buffer fosfato (2.5 ml, 0.2M pH 6.6) y con ferricianuro de potasio (2.5ml, 1%).

Se incubó la mezcla durante 20 minutos (50°C) y se adicionó 2.5 ml de tricloroacético (10%), posteriormente se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos, en una centrífuga marca Sorvall, rotor SS 34.

El sobrenadante de la reacción (2.5 ml) se mezcló con agua destilada (2.5 ml) y se adicionó cloruro férrico (0.5ml, 0.1%) y la absorbancia se midió a 700nm en un espectrofotómetro LKV. El incremento de la absorbancia de la mezcla de la reacción indica un incremento en la capacidad reductora.

**4. Contenido fenólico y de flavonoides.** La cantidad total de compuestos fenólicos en los extractos se determinó con el reactivo de

Folin-Ciocalteu (FC), de acuerdo a Singleton y Col., 1999 con algunas modificaciones.

Un mililitro del extracto preparado a 40µg/ml se aforó con agua a 50ml; 1 ml de esta solución diluida se mezcló con 2.5 del reactivo de FC (diluido 1:1 con agua destilada) y con 2 ml de carbonato de sodio (20%), la mezcla se calentó durante 10 minutos a 50°C. Se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 730nm con un espectrofotómetro Genesys 2 (figura 14). La cantidad de flavonoides se leyó a 730nm y la cantidad de fenoles fue cuantificada a 760nm usando el mismo espectrofotómetro a 20°C.

La curva de calibración se preparó con pirogalol (5.0 - 20 µg/ml) para determinar fenoles y quercetina (1 -25 µg/ml) para determinar polifenoles. El contenido fenólico y de flavonoides de los extractos (acuoso hervido, acuoso sin hervir y etanólico) se expresó como miligramos equivalentes de pirogalol o de quercetina por gramo de muestra seca respectivamente.

**5. Efecto reductor del extracto de maca sobre el peróxido de hidrógeno.** La capacidad reductora del extracto de maca fue determinada de acuerdo al método de Ruch y Col., (1989).

Una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40mM) fue preparada en buffer fosfato (pH 7.4), el extracto de maca a una concentración de 30 µg/ml en 3.4 ml de buffer fosfato fue añadido a una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.6ml, 40 mM). La absorbancia de la mezcla de reacción fue leída a 230nm. La solución blanco solo contenía buffer fosfato sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El porcentaje de la capacidad reductora del extracto de maca y de la vitamina E (estándar) fue calculado como

$$\% \text{ de capacidad reductora del H}_2\text{O}_2 = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

Donde A<sub>0</sub> es la absorbancia del control.

A<sub>1</sub> es la absorbancia en presencia del extracto de maca o del estándar (Elmastas y Col., 2005).

#### **IV. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE E HIPOLIPEMIANTE DE MACA EN ANIMALES HIPERCOLESTEROLÉMICOS**

**1. Preparación de la dieta.** Se utilizó una dieta preparada por el Instituto Nacional de Salud (Chorrillos), cuya composición fue la siguiente:

Proteína	17.0%	min
Grasa	3.0%	min
Fibra	6.0%	min
Humedad	14.0%	máx
Ceniza	10.0%	máx

A todas las dietas se le adicionó 3% de colesterol (Dieta Hipercolesterolémica) y de acuerdo al diseño experimental se añadió maca molida (5 g%) de los diferentes ecotipos.

Una vez preparada las dietas, estas fueron cernidas (tres veces) a través de finos coladores para lograr una buena mezcla, y guardadas en recipientes en refrigeración a 4°C. hasta el momento de la preparación de las dietas.

**2. Hipercolesterolemia experimental.** Se emplearon 30 ratas albinas machos Sprague-Dowley procedentes del Instituto Nacional de Salud (Chorrillos), siendo observadas durante una semana antes del inicio del experimento, para confirmar su buen estado de salud (Figura 14) .

Los animales fueron seleccionados aleatoriamente, con un peso promedio de 200-500g. Fueron colocadas en jaulas individuales en el bioterio del Centro de Investigación Bioquímica y Nutrición (CIBN), controlándose su peso diariamente y el alimento que consumieron durante los dos meses del experimento. Los animales de experimentación estuvieron sometidos a las siguientes condiciones ambientales: temperatura promedio 22-25°C y una humedad promedio del 75%, con un fotoperiodo

estacional. Se les administraba diariamente 20 gramos de alimentos y recibían agua *ad libitum*.

**3. Evaluación del efecto antioxidante e hipolipemiante de cuatro ecotipos de maca.** Para el estudio se escogieron cuatro ecotipos (amarillo, rojo, morado y negro).

Antes del inicio del experimento se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, para determinar los valores basales del perfil lipídico (colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol y Triglicéridos) y antioxidante (Vitamina A, Vitamina C y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico-Malondialdehído (TBRAS-MDA). Los animales de experimentación (n=30) fueron separados en 5 grupos; se les administró dieta enriquecida con colesterol a 3g%, y 5g% de harina de maca en el alimento, *ad libitum*, de acuerdo al siguiente esquema.

- Grupo A: Hipercolesterolémico + Maca Amarilla
- Grupo B: Hipercolesterolémico + Maca Negra
- Grupo C: Hipercolesterolémico + Maca Roja
- Grupo D: Hipercolesterolémico + Maca Morada
- Grupo E: Control Positivo (Hipercolesterolémico)

El tratamiento duró 60 días. Los animales fueron sometidos a ayuno de 16 horas antes de ser sacrificados por decapitación. Se colectó muestras de sangre para medir parámetros bioquímicos y capacidad antioxidante.

**4. Evaluación del efecto hipolipemiante y antioxidante de la maca versus la estatina.** Para el estudio se utilizaron cuatro ecotipos de maca (amarillo, morado, negro y morado).

**a. Preparación de la estatina.** La atorvastatina (10mg/pastilla) fue triturada y disuelta diariamente en suero fisiológico, antes de la administración oral, se usó una sonda orogástrica.

Se prepararon concentraciones de 10, 20 y 40 mg que se administraron a los animales a una dosis correspondiente a 14, 28 y 56  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso del animal todos los días entre las 8 y 9 a.m vía orogástrica, después de pesarlos (Figura 16).

Los animales de experimentación ( $n=30$ ) fueron separados en 5 grupos, de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo A: Maca Amarilla.

Grupo B: Atorvastatina (10mg/día).

Grupo C: Atorvastatina (20mg/día).

Grupo D: Atorvastatina (40mg/día).

Grupo E: Control Positivo (Hipercolesterolémico).

El tratamiento duró 30 días luego de los cuales los animales fueron sacrificados por decapitación, después de 16 horas de ayuno, colectándose muestras de sangre, para la obtención de suero y/o plasma que se utilizó para medir la capacidad antioxidante y el perfil lipídico. Se evaluó los niveles de fibrinógeno y el porcentaje de inhibición de la enzima HMGCoA reductasa cuando se comparó los grupos que recibieron la estatina.

**5. Evaluación de los niveles de peroxidación lipídica en suero.** La lipoperoxidación fue medida a través TBARS-MDA, las que fueron cuantificadas por el método de Buege y Aust (1978) con las modificaciones de Suárez (1995), usando el coeficiente de extinción molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , que representa los niveles de malondialdehído, un producto final de lipoperoxidación. Se procedió de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Schemedes y Col., (1987), basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del compuesto malonaldehído, formando un producto (TBARS-MDA) cromóforo rosado, que fue leído en un espectrofotómetro marca LKV a 535 nm.

**6. Determinación de vitamina A en plasma.** El retinol plasmático fue cuantificado mediante el método espectrofotométrico de Peterson y Wiggins

(1954) con alguna modificación (Valdivieso R. no publicado). Las muestras y el estándar (retinol) fueron leídas en un espectrofotómetro LKV a 325nm.

**7. Determinación de vitamina C en suero.** Se usó un método de Folin Ciocalteu descrito por Jagota SK, (1992). Se usó como estándar ácido ascórbico (10mg/dL) con el cual se preparó una curva estándar para los efectos de la cuantificación. El complejo formado fue leído a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 2.

**8. Evaluación del perfil lipídico, fibrinógeno, porcentaje de inhibición de la HMG CoA reductasa en suero.** Se realizó la evaluación del perfil lipídico, índices de riesgo para problemas cardiovasculares, fibrinógeno, el porcentaje de inhibición de la HMG CoA reductasa, los niveles de peroxidación lipídica y vitamina C.

Los animales de experimentación (n=24) fueron separados en 4 grupos, de acuerdo al siguiente esquema.

Grupo A: Dieta Hipercolesterolémica+ Maca Amarilla

Grupo B: Dieta Hipercolesterolémico + atorvastatina (10mg/día)

Grupo C: Dieta Normal (control negativo)

Grupo D: Dieta Hipercolesterolémica (control positivo).

Luego de 30 días de tratamiento, los animales con 16 horas de ayuno fueron sacrificados por decapitación, colectándose muestras de sangre para obtener suero y determinar el perfil lipídico (colesterol, HDL, LDL y triglicéridos). También se evaluó los niveles de fibrinógeno, lipoperoxidación, vitamina C y el porcentaje de inhibición de la enzima HMGCoA reductasa.

Se recogieron muestras de tejido aórtico de los cuatro grupos de estudio para los cortes histológicos y se realizó la evaluación anátomo-patológica.

#### **a. Determinación Bioquímica del Perfil Lipídico**

- Medición de Colesterol Total en Suero, se usó el método enzimático a punto final Colesterol ester hidrolasa/ Colesterol

oxidasa/peroxidasa, el cual reacciona con el sistema cromogénico dando lugar a un compuesto coloreado que fue leído en un Espectrofotómetro LKV a 505nm (Método descrito por Trinder, 1969).

- Determinación de HDL- colesterol, el HDL-colesterol es obtenido precipitando selectivamente a las apoB, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL y quilomicrones mediante sulfato de dextran (PM=50.000) y magnesio, quedando el primero en solución. El HDL-colesterol en solución se determina por acción de las enzimas Colesterol Ester Hidrolasa/ Colesterol oxidasa/ peroxidasa desarrollando un compuesto coloreado (grosella) que fue leído en un Espectrofotómetro LKV a 505nm. (Método descrito por Trinder, 1969).

- Medición de LDL-colesterol, después de obtener suero libre de hemólisis, el LDL-colesterol obtenido se aisló precipitándolo selectivamente mediante el uso de Heparina, en una solución con un punto isoeléctrico adecuado, quedando en solución las otras fracciones del colesterol total HDL y VLDL. El LDL-colesterol precipitado se determina obteniendo la diferencia entre el colesterol total y las otras fracciones HDL y VLDL que permanecen en solución y mediante la técnica descrita para la medición de colesterol total (Método descrito por Trinder, 1969).

- Determinación de Triglicéridos, se usó el método enzimático con la participación de la lipasa/glicerol Kinasa/Glicero fosfato oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4 aminoantipirina (4-AAP) y 3-hidroxi-2,4,6- ácido tribomobensoico (TBHB) en reacción catalizada por la peroxidasa para producir un compuesto quinoneimino de color rojo. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en suero. El complejo coloreado fue leído en un espectrofotómetro LKV a 540nm.

**b. Determinación de Fibrinógeno.** El equipo de determinación de fibrinógeno funcional (Trombina, Diagnostic Grifols, S.A), está constituido por trombina bovina con estabilizantes y conservantes. El *test* mide el tiempo de transformación de fibrinógeno a fibrina al incubar el plasma, diluido 1:10 con tampón de Owren y en exceso de trombina, siendo la concentración de fibrinógeno proporcional al tiempo medido (Claus, A. 1957).

**c. Determinación del porcentaje de inhibición de la HMG CoA Reductasa.** Se consideró como 100% de actividad de la enzima del grupo **control negativo** y se fue comparando con cada uno de los grupos que recibieron atorvastatina (10,20 y 40 mg/día) y maca amarilla.

**d. Cortes histológicos de aorta.** Se usó la técnica de hematoxilina-eosina . Se obtuvo un fragmento del tejido aórtico y se almacenó en solución de formol al 10% en agua destilada; para realizar el correspondiente estudio histológico. Las muestras de aorta embebidas en formol fueron puestas en parafina. Se obtuvieron secciones de 3  $\mu$  con un micrótopo, los cortes fueron puestos en lámina de vidrio y coloreados con la tinción de hematoxilina-eosina. La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico. Los núcleos se observaron de color azul, los citoplasmas en color rosa y los glóbulos rojos en tono rojo-anaranjado.

## **V. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS DE MACA AMARILLA Y ATORVASTATINA A NIVEL HEPÁTICO**

Antes del inicio del experimento se tomaron muestras de sangre para los valores basales. Los animales de experimentación (n=24) fueron separados en 4 grupos, de acuerdo al siguiente esquema.

Grupo A: Hipercolesterolémico+ Maca Amarilla

Grupo B: Hipercolesterolémico+ atorvastatina (10mg/día)

Grupo C: Hipercolesterolémico

Grupo D: Control negativo.

A los 60 días de tratamiento, los animales con 16 horas de ayuno fueron sacrificados por decapitación, colectándose muestras de sangre para la determinación de las transaminasas (TGO y GOT) y  $\gamma$ -Glutamil transferasa y se tomaron muestras de tejido hepático para los estudios histológicos.

### **1. Determinación de la Transaminasa Glutamato Oxalacetato (TGO).**

Las reacciones de transaminación mas frecuentes son aquellas en las que

participa en alfa-cetoglutarato cuya aminación produce glutamato. Por consiguiente, casi todos los aminoácidos pueden ceder grupo amino al alfa-cetoglutarato, a través de una reacción de transaminación para formar el cetoácido correspondiente y glutamato.

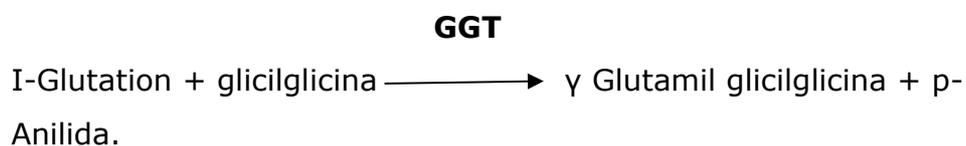
## **2. Determinación de la Transaminasa Glutámico Pirúvico (TGP).**

La reacción catalizada por la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) es igual para la que cataliza la Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO), solamente cambiando el aminoácido por aspartato y el cetoácido por oxaloacetato, es por eso que se les llama también Alanina Aminotransferasa (ALT) y Aspartato Aminotransferasa (AST), respectivamente, por el aminoácido utilizado.

- Los niveles normales de GOT en sangre humana son: 5-40 U/L.
- Los niveles normales de GPT en sangre humana son: 5-30 U/L.

## **3. Determinación de $\gamma$ Glutamil transferasa (GGT) (E: C 2.3.2.2).**

La determinación de la GGT se realizó usando método enzimático prueba cinética, que se funda en la siguiente reacción:



Los valores de referencia en humanos: Varones 5-85 U/L

Mujeres 5-55 U/L

**4. Análisis de Fosfatasa Alcalina (PAL).** La fosfatasa alcalina hidroliza el fosfato p-nitrofenilo con formación de p-nitrofenol libre que en medio alcalina se transforma en un ión nitrofenilado de color amarillo intenso proporcional a la actividad de la enzima. Leer a longitud de onda de 405 nm. El color es estable 20 minutos.

Valores normales en suero humanos:

Adultos: 13 a 40 U/L

Niños: 45 a 115 U/L

**5. Evaluación del daño hepático.** Los hígados obtenidos de los animales de experimentación después del tratamiento, fueron pesados, se obtuvo una fracción de aproximadamente 1 g del lóbulo mayor y se almacenó en solución de formol al 10% en agua destilada. Los tejidos fueron procesados e incluidos en parafina, luego los cortes histológicos de 3  $\mu$  fueron coloreados con hematoxilina-eosina, para realizar el correspondiente estudio histológico.

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico. Los núcleos se observaron de color azul, los citoplasmas en color rosa y los glóbulos rojos en tono rojo-anaranjado.

**6. Pesos corporales de los animales.** Los animales fueron pesados al inicio del experimento y durante el tiempo que duró la investigación (30 o 60 días) en una balanza para pesar animales, marca OHAUS.

## **VI. ANALISIS ESTADISTICO**

Se utilizó el análisis de varianza simple y para los datos que resultaron con diferencia significativa se empleó la prueba t de Student. En todos los casos el nivel de significación se fijó para  $p < 0,05$ .

Cuando se analizó el efecto de la estatina (atorvastatina) las diferencias significativas entre medias fueron calculadas con la **prueba de TUKEY**. Valores de  $p \leq 0.05$  se tomaron como significativos.

# RESULTADOS

## I. ESTUDIO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO

### 1. Actividad antioxidante IC<sub>50</sub>

Como se muestra en la Figura 11.c el extracto etanólico (2- 20 mg/ml) capta DPPH (100  $\mu$ M) en una relación dosis dependiente. Observándose IC<sub>50</sub> aproximado de 10 mg/ml. Cuando se trabajó con el extracto acuoso de maca (sin hervir y hervido) el IC<sub>50</sub> puede ser de 0.800 mg/ml (Figura 11.a y b).

La Tabla 1. muestra la capacidad reductora de la maca en diferentes concentraciones y del estándar (ácido ascórbico) usando el método de reducción del ferricianuro de potasio. El poder reductor de la maca y del ácido ascórbico se incrementa a medida que aumenta la concentración de las muestras de estudio.

A mayores concentraciones, la maca muestra un poder reductor efectivo, en especial el extracto acuoso con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). El poder reductor puede ser expresado en el siguiente orden, extracto acuoso de maca muestra mayor efecto reductor que el extracto etanólico de maca (Tabla 1).

La capacidad antioxidante de los fenoles es altamente reconocida, se relaciona con su capacidad para secuestrar especies reactivas del oxígeno (ERO), como se muestra en la Tabla 2. Se halló una mayor concentración de fenoles en los extractos acuosos (hervido y sin hervir) sin ser significativos entre ambos y en el caso de los flavonoides totales también mostró el mismo patrón de bioquímico. El extracto etanólico mostró una menor concentración de fenoles y de flavonoides totales, con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a los dos extractos acuosos (Figura 12).

Al evaluar el efecto reductor del extracto de maca y del estándar (vitamina E) sobre el peróxido de hidrógeno (Figura 13) , se reveló que el mayor porcentaje del poder reductor era el del extracto etanólico (43.32%), seguido del extracto acuoso hervido (37.14%) y por último el 6.9 % del extracto acuoso sin hervir, en comparación con el estándar (vitamina C) que fue del 13%, todas las determinaciones se trabajaron a la misma concentración de 30 µg/ml y por duplicado.

## **II. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE E HIPOLIPEMIANTE DE MACA EN ANIMALES HIPERCOLESTEROLÉMICOS**

### **1. Niveles de peroxidación lipídica**

Dependiendo del ecotipo de maca, la administración durante dos meses de una dieta rica en colesterol a animales de experimentación, mostró en suero, una reducción de los niveles de lipoperoxidación desde 8,28% hasta 28,14% comparado con el control positivo que solo recibió dieta con colesterol al 3% (Tabla 3).

### **2. Niveles de de vitamina A y vitamina C**

Los resultados muestran que la concentración sérica de vitamina C, después de la administración de los cuatro ecotipos de maca se incrementó en un rango de 14,4% a 81,7% respecto al grupo control positivo (hipercolesterolémico) observándose una mejor respuesta para la maca amarilla (81,7%).

En cuanto a los niveles de vitamina A se observó que el porcentaje de variación de la concentración en suero fue desde -0.9% a 7%, observándose que el grupo hipercolesterolémico que consumió harina de maca amarilla mostró la mayor variación (Tabla 4).

### **3. Variación del peso corporal en ratas con hipercolesterolemia experimental alimentadas con cuatro ecotipos de maca pulverizada**

La ingesta de dietas por los animales de experimentación (dieta solo con colesterol y dieta con colesterol más la harina de los diferentes ecotipos de maca) fue un promedio de 10 g/día, sin diferencia significativa entre los grupos. Se observó un mayor porcentaje de ganancia de peso en el grupo que consumió harina de maca amarilla (6,6%), seguida de los grupos que recibieron las dietas tanto con harina de maca morada y roja (5,4%) y el grupo que consumió harina de maca negra la ganancia fue menor (-0,5%) (Tabla 5).

**4. Perfil lipídico en suero de ratas administradas con diferentes ecotipos de harina de maca.** La Tabla 6, muestra que el grupo que recibió como parte de su dieta la harina de maca amarilla, produjo una reducción de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos de 36.2, 23.8 y 8.6% respectivamente respecto al grupo control positivo (grupo hipercolesterolémico). La administración de la maca amarilla redujo en 9.8% los niveles de HDL-colesterol.

El efecto hipolipemiante también se observó tras la administración de maca amarilla, negra, roja y morada que va de mayor a menor porcentaje, pero en cuanto a los valores de LDL, la administración de maca roja y morada produjo un incremento de 12.1% y 19.3% respectivamente de esta lipoproteína con relación al control positivo (hipercolesterolémico).

**5. Índice de riesgo coronario.** Con los valores del perfil lipídico de los 5 grupos de estudios se halló el índice CT/HDL y LDL/HDL como la relación de riesgo de problemas cardiovasculares, observándose que la administración de maca amarilla redujo ambos parámetros al compararlo con el control positivo (Tabla 7), sin embargo los tres ecotipos de maca negro, morado y rojo también disminuyeron estas dos relaciones de riesgo.

**6. Perfil lipídico de animales hiperlipidémicostratados con maca o atorvastatina** La Tabla 8, muestra el perfil lipídico de animales experimentalmente hipercolesterolémicos que recibieron tratamiento con

la atorvastatina en diferentes dosis *versus* la administración de maca amarilla, donde observamos diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los valores de colesterol total en el grupo que recibió el fármaco (10mg/día) con respecto al control positivo y también existe diferencia significativa en el grupo que recibió la maca amarilla respecto al control positivo.

Respecto a los valores de LDL, el grupo que recibió la maca amarilla y el grupo que recibió la dosis del fármaco (10 mg/día) mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control positivo, también se observó diferencia significativa en los grupos que recibieron la atorvastatina (20 y 40 mg/día) con respecto al grupo control positivo y al grupo que recibió maca amarilla.

La administración de atorvastatina (10 mg/dl) causó, como era de esperar, una reducción de los niveles de colesterol, LDL, HDL y triglicéridos en un 16.6, 26, 27 y 7.3% respectivamente respecto al grupo control positivo. El mismo patrón se observó en el grupo hipercolesterolémico que recibió la maca amarilla con respecto al control positivo, mostraron una disminución de la concentración de Colesterol sérico, LDL, HDL y triglicéridos de 28.9, 13.6, 3.7 y 55.1% respectivamente.

Nótese que el fármaco redujo los triglicéridos sanguíneos en 7,3% mientras que con el tratamiento de la harina de maca amarilla, la reducción fue de hasta 43,3%, es decir que la maca es más efectiva.

También es importante resaltar que la administración de maca sólo redujo los niveles de HDL un 3.7% comparado con la dosis menor de la atorvastatina que fue de un 27% (Tabla 9).

Al analizar el efecto de la atorvastatina a diferentes dosis, sobre los niveles de HDL y LDL, se evidencia la reducción en los cambios porcentuales séricos, pero a dosis mayores de 10 mg/día, los cambios porcentuales son menores (Figura 17).

Respecto al efecto de la atorvastatina sobre los niveles de los triglicéridos plasmáticos se observó en la Figura 18, un incremento negativo que se correlaciona con la dosis usada.

Los índices CT/HDL y LDL/HDL son usados como marcadores de riesgo cardiovascular, al analizar estos valores, se observó que la administración de la harina de maca amarilla redujo ambos parámetros con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al compararlo con el control positivo (hipercolesterolemia) y el control negativo; el índice CT/HDL en los animales tratados con atorvastatina, mostró diferencia significativa en el grupo que recibió la dosis más alta respecto al control positivo, tal como se aprecia en la Tabla 10.

Respecto a los niveles de fibrinógeno en los grupos que se administró las diferentes dosis de la atorvastatina mostró una ligera disminución de esta proteína de la coagulación como se muestra en la Tabla 11 de manera semejante se observó el comportamiento de los animales tratados con harina de maca ecotipo amarillo, en comparación al grupo control positivo; estas diferencias no tuvieron significancia estadística ( $p > 0.05$ )

En relación al peso de los animales de experimentación después de 30 días tratamiento, la Tabla 12, muestra que la administración de la estatina (10mg/día) produjo una ganancia mínima de peso que resulta menor que el control positivo, en tanto los animales tratados con harina de maca, tuvieron una ganancia de peso semejante al control positivo.

El análisis de la ganancia de peso desde una perspectiva farmacológica se muestra en las Tabla 9, en las que se pueda apreciar que al incremento de la dosis de la estatina produjo una reducción de la ganancia de peso de los animales tratados.

Los resultados de las pruebas de análisis de daño oxidativo (lipoperoxidación), por medio de TBARS-MDA en los 5 grupos se presenta en la Tabla 13, y se aprecia que tanto con el tratamiento del fármaco atorvastatina como con la harina de maca ecotipo amarillo reveló una

reducción del daño oxidativo, que en ambos tratamientos fue significativa respecto al control positivo, se debe resaltar que la maca produjo en los animales de experimentación mayor protección frente al daño oxidativo.

### **7. Perfil lipídico en ratas hipercolesterolémicas tratadas con maca ecotipo amarillo comparada con atorvastatina (10mg/día)**

En la Tabla 14, se observan las concentraciones de triglicéridos, colesterol y sus fracciones HDL y LDL en animales hipercolesterolémicos que recibieron tratamiento durante 30 días, con atorvastatina y maca ecotipo amarillo. En el grupo hipercolesterolémico (control positivo) todos los valores subieron respecto al control negativo (sin dieta hipercolesterolémica), los animales con tratamiento tanto farmacológico (atorvastatina 10 mg/día) como el que recibió la harina de maca ecotipo amarillo, presentaron valores de los analitos estudiados menores al grupo control negativo, pese a que recibieron dieta hipercolesterolémica.

**8. Índice de riesgo cardiovascular.** Al analizar los resultados de los índices CT/HDL y LDL/HDL entre los grupos de estudio, lo más resaltante es que el grupo que recibió el ecotipo de maca amarillo mostró valores menores, sin diferencia significativa con respecto al control negativo pero si con respecto al control positivo, los datos se muestran en la Tabla 15.

**9. Niveles de fibrinógeno.** Son mostrados en la Tabla 16, de los grupos experimentales con dieta hipercolesterolémica tanto con maca como con atorvastatina tuvieron valores menores que el grupo control negativo, sin diferencia significativa, mientras que los animales sin tratamiento (control positivo) presentaron concentraciones significativamente mayores ( $p < 0,05$ ).

**10. Porcentaje de inhibición de la HMG CoA reductasa.** El estudio del porcentaje de inhibición de la enzima HMG CoA reductasa, enzima clave de la síntesis de colesterol hepático, reveló que el tratamiento con harina de maca ecotipo amarillo produjo niveles de inhibición semejantes al producido por atorvastatina, los valores se presentan en la Tabla 17.

**11. Niveles de peroxidación lipídica y vitamina C en suero.** Se muestran en la Tabla 18, el grupo control positivo presentó el doble de los niveles de liperoxidación con respecto al grupo control negativo, mostrando un severo daño oxidativo causado probablemente por el consumo de la dieta hipercolesterolémica; en contraposición los valores de este marcador del daño oxidativo en animales hipercolesterolémicos, que recibieron atorvastatina mostraron un incremento de  $14,96 \times 10^{-6}$  mol/L.

grupo control negativo  $9.66 \times 10^{-6}$  mol/L y la harina de maca fue  $12.44 \times 10^{-6}$  mol/L, por lo que se demuestra que la maca tiene efecto protector.

La concentración de vitamina C en suero fue menor en el grupo con tratamiento de atorvastatina (semejante al grupo control positivo) mientras que los animales que recibieron harina de maca ecotipo amarillo presentaron los valores de vitamina C bastante semejantes al grupo control negativo, pese a que el grupo de maca, recibió una dieta hipercolesterolémica.

**12. Estudios anatomopatológico de tejido aórtico.** Se realizaron cortes histológicos de tejido aórtico que fueron coloreados con hematoxilina-eosina revelando diferencia en el acúmulo de grasa del control positivo y el negativo, alteración del endotelio vascular con acumulo de cristales de colesterol y lipófagos (Figura 19 a y b) que son macrófagos que han fagocitado grasa, estos resultados mostraron una imagen característica de tejido con formación inicial de placa ateromatosa por acúmulo de lípidos.

En las figuras de los cortes histológicos de aorta de animales con dieta hipercolesterolémica (Figura 19 c) que recibieron atorvastatina se observó una discreta lesión endotelial, lipófagos y un área de necrosis. En el caso de los animales del grupo maca (Figura 19 a y b) se observa escasos lipófagos y cristales de colesterol, y también infiltración de grasa moderada.

### **III. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS DE MACA AMARILLA Y ATORVASTATINA A NIVEL HEPÁTICO**

#### **1.- Enzimas marcadoras de daño hepático**

Los niveles de los marcadores enzimáticos de la función hepática, según los grupos de estudios se muestran en la Tabla 19, donde se observó que la TGO se incrementó en el grupo hipercolesterolémico y el grupo que recibió la maca ( $p < 0.05$ ) con respecto al control negativo, pero entre ambos grupos no existió tal diferencia; en cuanto al grupo que recibió la atorvastatina el valor de la TGO fue el mayor de todos los grupos de estudio y presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo hipercolesterolémico (control positivo), al grupo que recibió maca y el control negativo (sin tratamiento).

Los valores de TGP en todos los grupos fueron elevados respecto al control negativo, con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ); el grupo de mayores valores fue el que consumió dieta hipercolesterolémica. Entre el grupo que recibió atorvastatina y maca no hubo diferencia significativa.

Respecto a los valores de la Gama Glutamil transferasa (GGT), se visualizó que los grupos de control positivo y atorvastatina tuvieron los valores más altos y entre ellos no hubo diferencia significativa, el grupo que recibió maca y el control negativo tuvieron los valores más bajos, entre ellos presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), además el grupo que recibió maca mostró valores significativamente ( $p < 0.05$ ) más bajos que el control positivo y el tratado con atorvastatina.

En cuanto a los niveles de fosfatasa alcalina se observó que el grupo hipercolesterolémico mostró valores mayores y significativo ( $p < 0.05$ ) que el control negativo. El grupo que recibió atorvastatina fue el que presentó valores superiores de esta enzima, con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al compararlos con los otros grupos de estudio. El grupo que fue tratado con maca tuvo valores ligeramente elevados al grupo control negativo, sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

## **2.- Estudios anatomopatológico de tejido hepático**

En cuanto los estudios histológicos del tejido hepático, el grupo que consumió maca, se observó al parénquima hepático con núcleos pulverulentos debido al aumento de la cromatina en el endocariolema; el citoplasma también mostró figuras apoptóticas indicadores de un proceso de adaptación frente a estímulos de hipercolesterolemia en la dieta (Figura 21 a) al comparar con el control negativo (Figura 22 b).

El tejido hepático del grupo que recibió atorvastatina, mostró indicadores tisulares de esteatosis hepática inicial, como se evidenció en la (Figura 21 b) en comparación con el grupo hipercolesterolémico (Figura 22 a).

## **TABLAS Y FIGURAS**

**TABLA 1**  
**CAPACIDAD REDUCTORA DE EXTRACTOS DE HARINA DE MACA**  
**EN DIFERENTES CONCENTRACIONES**

<b>µg/mL</b>	<b>Extracto Acuoso hervido</b>	<b>Extracto Acuoso sin hervir</b>	<b>Extracto Etanólico</b>	<b>Estándar</b>
5	0,165	0,12	0,11	0,160
15	0,302	0,29	0,25	0,382
30	0.592	0,52	0,45	0,688

La capacidad reductora fue expresada en valores de absorbancia. Se usó tres extractos de maca y un estándar (ácido ascórbico) en el experimento. Los resultados indicados son el promedio de tres determinaciones.

**TABLA 2**  
**CONTENIDO DE FENOLES Y FLAVONOIDES EN DIFERENTES**  
**EXTRACTOS DE HARINA DE MACA ECOTIPO AMARILLO.**

<b>EXTRACTOS DE MACA</b>	<b>FENOLES TOTALES mg pirogallol/g de polvo seco</b>	<b>FLAVONOIDES mg quercitina/g peso seco</b>
Acuoso sin hervir	157.45 ± 35.3 (a)	93.4 ± 11.9 (c)
Acuoso hervido	143.11 ± 25.9 (b)	96.68 ± 6.7 (d)
Etanólico	67.3 ± 4.4 (a.b)	30.12 ± 2.1 (c,d)

Letras iguales indican diferencia significativa entre grupos ( $p < 0.05$ )  
 Por ejemplo, al comparar fenoles totales del extracto acuoso sin hervir presenta diferencia significativa con el extracto etanólico, donde ambos están asignados con la letra a.

**TABLA 3**  
**NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (TBARS-MDA) EN RATAS**  
**HIPERCOLESTEROLÉMICAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES**  
**ECOTIPOS DE MACA**

<b>GRUPO</b>		<b>TBARS - MDA</b> <b>μmol/L</b>	<b>% de</b> <b>reducción</b>
A	MACA AMARILLA	5.83 ± 0.50	16,7
B	MACA NEGRA	6.42 ± 0.09	8,28
C	MACA MORADA	6.02 ± 0.68	14
D	MACA ROJA	5.03 ± 0.23	28.1
E	CONTROL POSITIVO	7.00 ± 0.31	0
BASAL		3.96 ± 0.22	--

**n=6**

No existe diferencia significativa entre B-E y entre C-E ( $p > 0.05$ ) y existe diferencia significativa entre el grupo basal y los demás grupos ( $p < 0.05$ ). La liperoxidación lipídica se mide mediante la formación del complejo coloreado (TBARS - MDA).

**TABLA 4**  
**NIVELES PLASMÁTICOS DE VITAMINA A Y SÉRICOS DE VITAMINA C Y PORCENTAJE DE VARIACIÓN EN RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES ECOTIPOS DE MACA.**

GRUPO		VITAMINA C (mg/dL)	% de variación Vit. C	VITAMINA A (U/L)	% de variación Vit. A
A	MACA AMARILLA	1.89 ± 0.05	81,7	7.01 ± 0.02	7,0
B	MACA NEGRA	1.60 ± 0.12	53,8	6.60 ± 0.06	0,7
C	MACA MORADA	1.19 ± 0.21	14,4	6.49 ± 0.12	-0,9
D	MACA ROJA	1.38 ± 0.03	32,7	6.65 ± 0.11	1,5
E	CONTROL POSITIVO	1.04 ± 0.01	0,0	6.55 ± 0.09	0,0
0	BASAL	1.55 ± 0.02	---	6.80 ± 0.05	---

**n=6**

Control positivo recibió una dieta con colesterol (3%) y el grupo basal solo recibió dieta normal.

Comparación del Basal-B, C-E, C-D no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) para vitamina C.

Comparación B-E, C-E, D-E, B-C, B-D no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) para vitamina C.

**TABLA 5**  
**VARIACIÓN DE PESOS DE RATAS SOMETIDAS A DIFERENTES**  
**ECOTIPOS DE MACA.**

<b>TIEMPO</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>BASAL</b>
INICIO (g)	243,50	249,00	235,50	256,50	268,25	248.56
4 SEMANAS (4)	385,00	367,00	369,50	390,00	406,50	385.22
VARIACIÓN	141,50	127,00	134,00	138,25	138.25	136.66
% GANANCIA DE PESO	58,11	51,00	56,90	56,90	51,54	54.99

**n=6**

A) Dieta hipercolesterolémica y maca amarilla.

B) Dieta hipercolesterolémica y maca negra.

C) Dieta hipercolesterolémica y maca morada.

D) Dieta hipercolesterolémica y maca roja.

E) Dieta hipercolesterolémica.

Basal (dieta normal).

**Tabla 6**  
**PERFÍL LIPIDICO DE RATAS CON DIETA HIPERCOLESTEROLEMICA**  
**ALIMENTADAS CON DIFERENTES ECOTIPOS DE HARINA DE MACA.**

GRUPO		COLESTEROL mg/dl	LDL mg/dl	HDL mg/dl	TRIGLICERIDOS mg/dl
A	MACA AMARILLA	166.3± 0.05 *	95.0 ± 0.01*	42.0 ± 0.08 *	127.8 0.05*
B	MACA NEGRA	184.3 ± 0.08 *	122.3 ± 0.03 *	39.7 ± 0.05 *	102.0 ± 0.03 *
C	MACA MORADA	297.8 ± 0.01 *	139.7 ± 0.1 *	42.3 ± 0.13 *	124.8 ± 0.01 *
D	MACA ROJA	220.3± 0.12 *	148.6 ± 0.09*	40.3 ± 0.31 *	134.3 ± 0.01 *
E	Control positivo	261.3± 0.02*	124.6 ± 0.09 *	45.6 ± 0.1 *	148.8 ± 0.03 *
Basal	Control Negativo	99 ± 0.04*	62.9 ± 0.025 *	36.0 ± 0.03 *	101.0 ± 0.06 *

**n=6** (\*) Presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), cuando se comparan entre los grupos de cada uno de los parámetros del perfil lipídico. Así al comparar los niveles de colesterol del grupo hipercolesterolémico con el control negativo se observa diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

**TABLA 7**  
**INDICES DEL PERFIL LIPÍDICO DE RATAS ALBINAS, ALIMENTADAS**  
**CON DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA Y HARINA DE *Lepidium***  
***meyenii* Walp DE CUATRO ECOTIPOS**

ECOTIPOS DE GRUPO MACA		CT/HDL	LDL/HDL
A	MACA AMARILLA	3,95	2,26
B	MACA NEGRA	4,64	3,00
C	MACA MORADA	7,00	3,30
D	MACA ROJA	4,56	3,68
E	Control Positivo	5,72	2.73
Basal	Control Negativo	2,76	1,74

**n=6** INDICE de CT/HDL  $\leq 5,5$ : bajo riesgo de problemas cardio-vasculares. LDL/HDL  $\leq 3,5$ : bajo riesgo de presentar problemas cardio-vasculares.

**TABLA 8**  
**PERFIL LIPÍDICO DE RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS TRATADAS**  
**CON ATORVASTATINA Y HARINA DE MACA ECOTIPO AMARILLO**

GRUPO		COLESTEROL mg/dl	LDL mg/dl	HDL mg/dl	TRIGLICERIDOS mg/dl
A	Maca amarilla (500mg/día)	165 $\pm$ 0.02	99.2 $\pm$ 0.05	43.3 $\pm$ 0.07	114.3 $\pm$ 0.32
B	Atorvastatina (10 mg/día)	148 $\pm$ 0.12	85.3 $\pm$ 0.09	33 $\pm$ 0.06	236.0 $\pm$ 0.15
C	Atorvastatina (20 mg/día)	201 $\pm$ 0.41	107.94 $\pm$ 0.3	39.5 $\pm$ 0.12	237.0 $\pm$ 0.62
D	Atorvastatina (40 mg/día)	241 $\pm$ 0.62	118.2 $\pm$ 0.12	41.5 $\pm$ 0.41	226.5 $\pm$ 0.05
E	Control positivo	232 $\pm$ 0.32	114.75 $\pm$ 0.1	45 $\pm$ 0.09	254.5 $\pm$ 0.12

**n=6** Todos lo grupos de estudio presentan diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar cada uno de los parámetros bioquímicos del perfil lipídico.

**TABLA 9**  
**VARIACIÓN PORCENTUAL DEL CONSUMO DE HARINA DE MACA**  
**ECOTIPO AMARILLO Y ATORVASTATINA SOBRE LOS COMPONENTES**  
**DEL PERFÍL LIPÍDICO.**

<b>DOSIS</b>	<b>MACA</b> <b>(mg/día)</b>	<b>ATORVASTATINA</b> <b>(mg/día)</b>		
	<b>500</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>40</b>
Cambios de niveles de colesterol (%)	-28,9	-32,2	-13,3	3,9
Cambios de niveles LDL (%)	-13,6	-25,0	-5,9	3,0
Cambios de niveles HDL (%)	-3,7	-26,0	-12,2	-7,8
Cambios de niveles Triglicéridos (%)	-55,1	-7,3	-6,7	-11,0

Los cambios del colesterol, de LDL, HDL y triglicéridos fueron expresados en porcentajes. Tomando como base el 100% del colesterol (control positivo) comparándolo con cada uno de los grupos de estudio.

**TABLA 10**  
**ÍNDICES MARCADORES DE RIESGO CARDÍACO**

<b>GRUPO</b>		<b>CT/HDL</b>	<b>LDL/HDL</b>
A	Maca amarilla	3.81 ± 0.03	2.29 ± 0.62
B	Atorvastatina (10 mg/día)	4.48 ± 0.32 (b)	2.58 ± 0.12
C	Atorvastatina (20 mg/día)	5.09 ± 0.05 (a,b)	2.73 ± 0.33
D	Atorvastatina (40 mg/día)	5.81 ± 0.03	2.85 ± 0.52
E	Control Positivo	5.16 ± 0.19 (a)	2.55 ± 0.06

**n=6**

Las letras iguales en CT/HDL indican no diferencia significativa entre grupos ( $p > 0.05$ ).

En el índice LDL/HDL no hubo diferencia significativa entre grupos.

CT/HDL  $\leq 5.5$  bajo riesgo de problemas cardiovasculares.

LDL/HDL  $\leq 3.5$  bajo riesgo de problemas cardiovasculares.

**TABLA 11**  
**NIVELES DE FIBRINÓGENO EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS**  
**TRATADAS CON HARINA DE MACA AMARILLA COMPARADA CON**  
**ATORVASTATINA.**

<b>GRUPO</b>		<b>Fibrinógeno (mg/dL)</b>
A	Maca amarilla	185.3 ± 1.2 (a)
B	Atorvastatina (10 mg/día)	188.0 ± 8.58 (b)
C	Atorvastatina (20 mg/día)	189.2 ± 4.2 (c)
D	Atorvastatina (40 mg/día)	182.0 ± 2.5 (d)
E	Control Positivo	322.1 ± 0.31 (a,b,c,d)

**n=6**

Valores de referencia: de 200 a 400 mg/dL (en humanos)

Las letras iguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

entre grupos. El grupo E, control positivo presenta diferencia significativa con los grupos A, B, C y D ( $p < 0.05$ ).

**TABLA 12**  
**VARIACIONES DE PESOS CORPORALES DE RATAS**  
**HIPERCOLESTEROLÉMICAS TRATADAS CON MACA ECOTIPO**  
**AMARILLO COMPARADAS CON ATORVASTATINA**

	<b>GRUPO</b>	<b>PESO INICIAL</b>	<b>PESO FINAL</b>	<b>VARIACIÓN</b>	<b>% DE GANANCIA</b>	<b>Log (dosis)</b>
A	Maca amarilla	415,0	467,0	52,5	12,7	----
B	Atorvastatina (10 mg/día)	425,0	466,0	41,0	9,6	1
C	Atorvastatina (20 mg/día)	440,0	456,0	16,0	3,6	1,3
D	Atorvastatina (40 mg/día)	532,5,0	546,5	14,0	2,6	1,6
E	Control Positivo (Hipercolesterolémico)	392,5	442,5	50,0	12,7	-----

Todos los valores del peso de los animales estan expresados en gramos. La variación de los pesos se determinó restando peso final menos peso inicial. Siendo el 100% el peso inicial de cada uno de los grupos. **n=6**

**TABLA 13**  
**NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (TBARS – MDA) EN SUERO.**

	<b>GRUPO</b>	<b>TBARS - MDA umol/L</b>	<b>Significancia</b>
A	Maca amarilla (500mg/día)	12.5 ± 1.69	a
B	Atorvastatina (10 mg/día)	14.3 ± 2.1	b
C	Atorvastatina (20 mg/día)	13.4 ±1.1	c
D	Atorvastatina (40 mg/día)	13.1 ± 2.1	d
E	Control Positivo	20.4 ± 1.2	a,b,c,d

**n=6** Las letras iguales denotan diferencia significativa entre grupos ( $p<0.05$ ). El grupo E, control positivo presenta diferencia significativa con los grupos A, B, C y D. El daño oxidativo se mide mediante la formación del complejo coloreado (TBARS – MDA).

**TABLA 14**  
**CONCENTRACIONES SÉRICA DEL PERFÍL LIPÍDICO DE RATAS CON**  
**DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA Y TRATAMIENTOS.**

<b>DIETA</b>	<b>HIPER COLESTEROL MACA</b>	<b>HIPER COLESTEROL ATORVASTATINA</b>	<b>HIPER COLESTEROL (control positivo)</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>
TRIGLICERIDOS	142.8 ± 30.4 (a,c)	163.8 ± 23.4 (b,d)	275.66 ± 52.54 (c,d)	241 ± 19.4 (a,b)
COLESTEROL	180.3 ± 34 (a,b)	179.3 ± 23.6 (c)	244.66 ± 6.45 (a,b,c)	204.8 ± 15.3 (a)
LDL	123.9 ± 22.8 (b)	121.55 ± 40.11 (c)	169.7 ± 6.45 (a,b,c)	126.8 ± 28.58 (a)
HDL	39 ± 6.45 (c,d)	32 ± 2.5 (b,d)	32 ± 2.8 (a,c)	42 ± 6 (a,b)

**n=6** Letras semejantes indican diferencia significativa entre los grupos de estudio ( $p < 0.05$ ). Así los triglicéridos presentan diferencia significativa entre el grupo que recibió maca con el control negativo, donde ambos grupos presentan la letra a.

**Tabla 15**  
**INDICES DE RIESGO CARDIOVASCULAR DE RATAS CON DIETA**  
**HIPERCOLESTEROLÉMICA**

<b>INDICE</b>	<b>HIPER COLESTEROL + MACA</b>	<b>HIPER COLESTEROL + ATORVASTATINA</b>	<b>HIPER COLESTEROL (control positivo)</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>
CT/HDL	4.83 ± 1.65 (b)	5.6 ± 0.52 (c)	7.68 ± 0.68 (a,b,c)	4.96 ± 0.83 (a)
LDL/HDL	3.32 ± 0.99 (b)	3.79 ± 1.15 (c)	5.34 ± 0.60 (a,b.c.)	3.04 ± 0.64 (a)

Las letras iguales en CT/HDL indican diferencia significativa entre grupos ( $p < 0.05$ ), así por ejemplo el control positivo presenta diferencia significativa con respecto al control negativo, ambos asignados con la letra a.

En el índice LDL/HDL hubo diferencia significativa entre grupos, así por ejemplo al comparar el control positivo con el grupo que recibió maca muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), donde ambos están asignados con la letra b.

**TABLA 16**  
**NIVELES DE FIBRINÓGENO EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS,**  
**SEGÚN GRUPOS DE TRATAMIENTO.**

	<b>HIPER COLESTEROL + MACA</b>	<b>HIPER COLESTEROL +ATORVASTATINA</b>	<b>HIPER COLESTEROL (Control positivo)</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>
Fibrinógeno mg/dL	167.83 ± 36.4 (b)	193.83 ± 6.74 (c)	327.8 ± 77.8 (a.b.c)	195.5 ± 59.2 (a)

**n=6** Letras semejantes indican diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ), por ejemplo el control positivo presenta diferencia significativa con cada uno de los otros grupos.

Valores de referencia: 200 a 400 mg/dL (en humanos)

**TABLA 17**  
**PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA HIDROXIMETILGLUTARIL COA  
REDUCTASA.**

<b>GRUPO</b>	<b>% INHIBICION</b>
Hipercolesterolémico + maca	26,4
Hipercolesterolémico + atorvastatina	26,8
Hipercolesterolémico (Control positivo)	0

**n=6**

El porcentaje de activación de la enzima, se halló al tomar los valores de colesterol total del control positivo como 100% , luego compararlo con cada de los grupos de estudio y finalmente restar de 100 % de actividad de la enzima para hallar el porcentaje de inhibición.

**TABLA 18**  
**NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y VITAMINA C EN RATAS**  
**SEGÚN GRUPOS DE TRATAMIENTO.**

Tratamientos	HIPER COLESTEROL + MACA	HIPER COLESTEROL ATORVASTATINA	HIPER COLESTEROL (Control positivo)	CONTROL NEGATIVO
LIPOPEROXIDACION X 10 <sup>-6</sup> mol/L	12.44 ± 1.62 (a,d)	14.96 ± 3.53 (b)	20.44 ± 5.19 (c,d)	9.66 ± 0.95 (a,b,c)
VITAMINA C mg/dl	3.74 ± 0.69 (c)	2.66 ± 0.56 (b)	2.61 ± 0.065 (a.c)	3.51 ± 0.33 (a,b)

**n=6** Letras semejantes indican diferencia significativa entre los grupos (p<0.05). El grupo control negativo presenta diferencia significativa en relación a los otros grupos. Los niveles de peroxidación lipídica (TBARS-MDA) son expresados como x 10<sup>-6</sup> mol/L

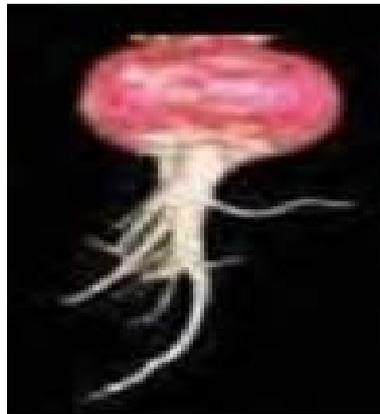
**TABLA 19**  
**NIVELES DE ENZIMAS SÉRICAS MARCADORAS DE TEJIDO EPÁTICO.**

U/L	HIPERCOLESTEROL + MACA	HIPERCOLESTEROL + ATORVASTATINA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
TGO	36 ± 2,58 (a,c)	54,75 ± 3,8 (c)	36 ± 2,45 (c)	24 ± 4,69 (a,b,c)
TGP	41,25 ± 11,35 (d.g)	44,25 ± 3,86 (h.f)	63,5 ± 4,43 (e,h,g)	35 ± 7,4 (d.e.f.)
GGT	15 ± 4,2 (l,p,q)	96,8 ± 57,5 (n,q)	60 ± 13,8 (m.p)	10 ± 2,5 (l,m,n)
PAL	215 ± 33,6 (k)	329,5 ± 12,27 (i,j,k)	233 ± 22.05 (i)	196,5 ± 35,5 (i.j)

**n=6**  
 Al comparar la diferencia entre los grupos de estudio, se obtuvo que letras semejantes indican diferencia significativa entre los grupos(p<0.05).



**FIGURA 1** Maca ecotipo amarillo.



**FIGURA 2** Maca ecotipo morada.



**FIGURA 3** Maca ecotipo negro.



**FIGURA 4** Maca ecotipo rojo.



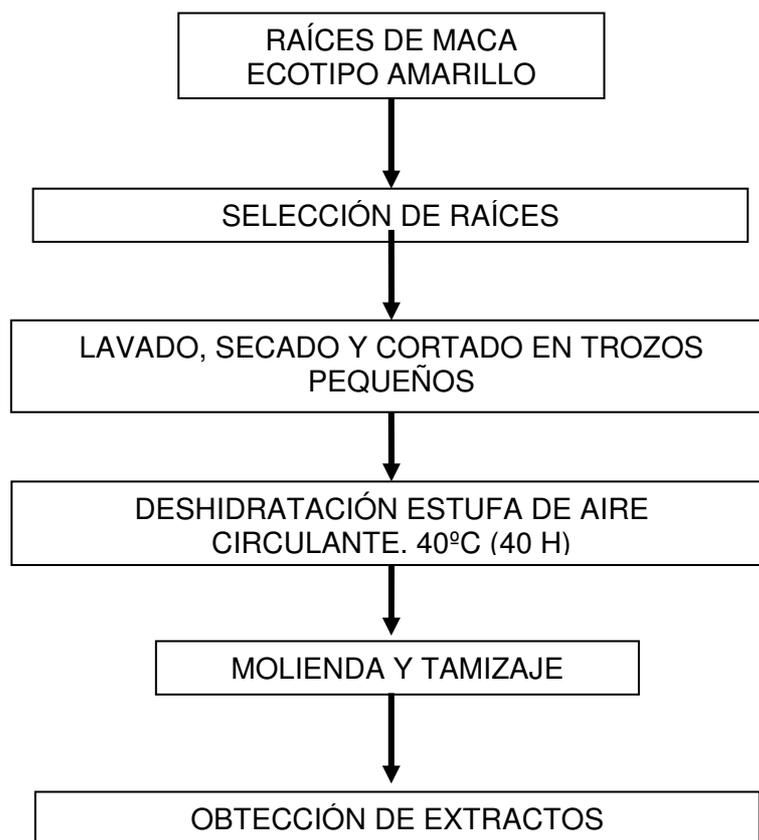
**FIGURA 5** Se muestra el molino Retsch K3 N° 5.



**FIGURA 6** Se muestra la colecta de la harina de maca.



**FIGURA 7.** Pulverizado de Harina de maca ecotipo amarilla usado en los experimentos



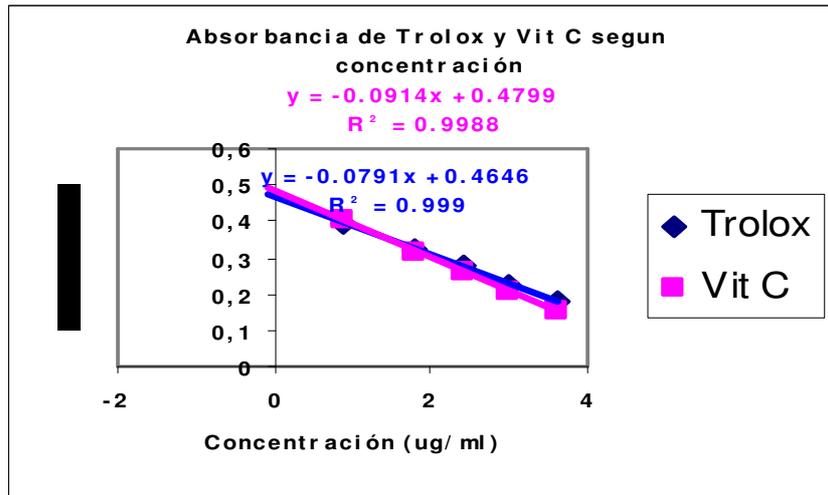
**FIGURA 8** Flujograma del procesamiento de las raíces de maca ecotipo amarillo para la preparación de extractos.



**FIGURA 9** Se muestra el extracto etanólico en la camara de secado

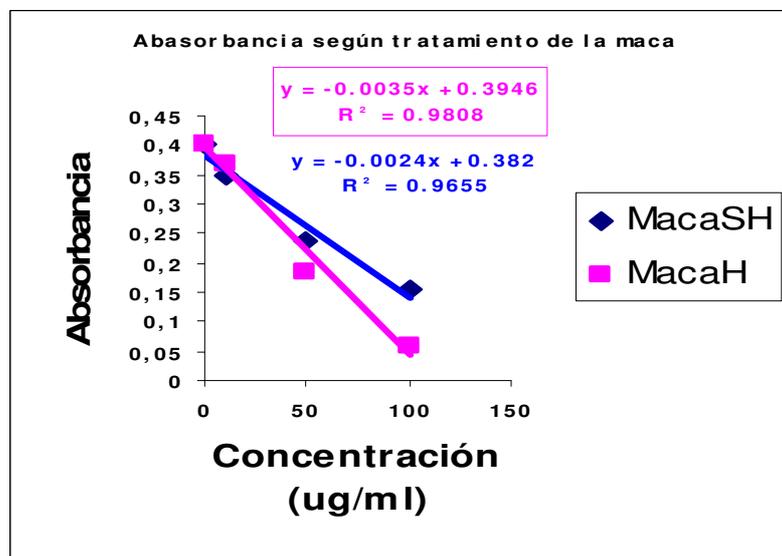


**FIGURA 10** Flujograma de la preparación de los extractos de maca pulverizado.

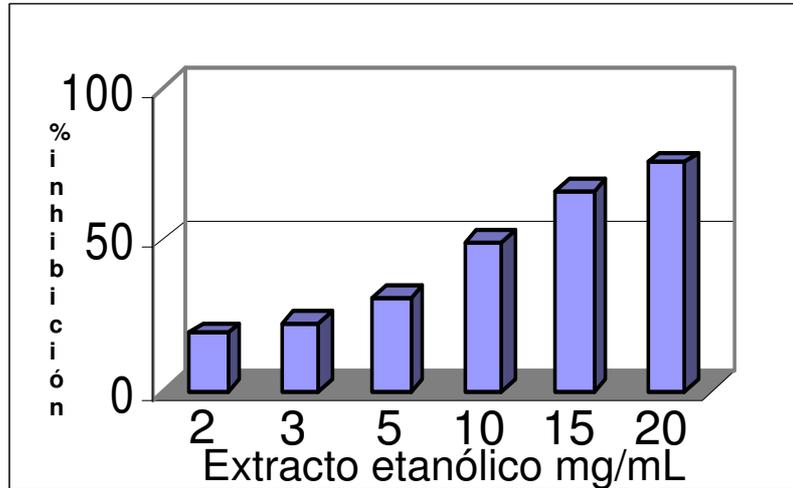


**FIGURA 11. a CURVA ESTÁNDAR DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DEL DPPH**

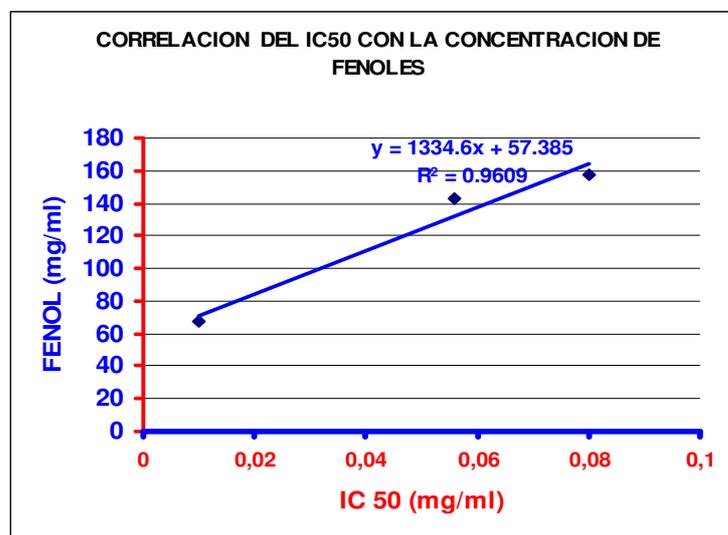
Se usaron dos estándares (trolox y vitamina C) presentando igual comportamiento lineal, con un  $r = 0.9988$  (vitamina c) y  $r = 0.999$  (Trolox).



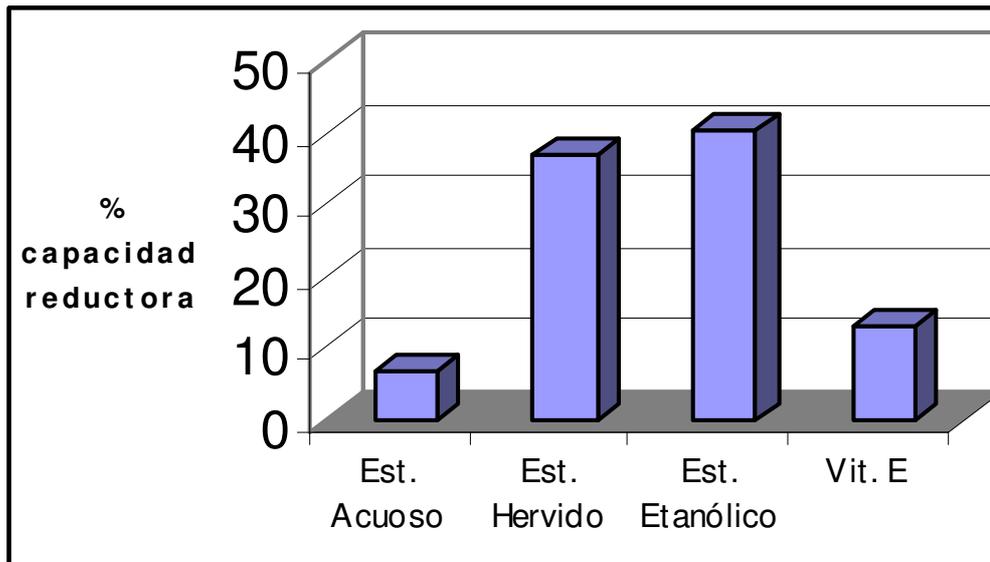
**FIGURA 11. b** Capacidad de captación de radicales libres de extracto acuoso de maca hervida (Maca H) y maca sin hervir (Maca SH). Presentando un comportamiento lineal con un  $r$  ligeramente diferente.



**FIGURA 11. c** Capacidad de captación de radicales libres de extracto etanólico. a mayor concentración del extracto etanólico se obtuvo una mayor inhibición, a partir de la concentración de 15 y 20mg/ml el porcentaje de inhibición supera el 50%.



**FIGURA 12** Correlación del IC50 con las concentración de fenoles en harina de maca ecotipo amarillo, con un  $r=0.9609$ .



**FIGURA 13 EFECTO REDUCTOR DE EXTRACTO DE MACA SOBRE EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

Los extractos y la vitamina E se trabajaron a una concentración de 30µg/ml. Observándose que los extractos de maca etanólicos y hervido mostraron una mayor capacidad reductora porcentual al compararlos con el estándar (vitamina E) y el extracto de maca acuoso sin hervir.



**FIGURA 14** Animal de experimentación *Ratus ratus*, variedad Sprague-Dowley.

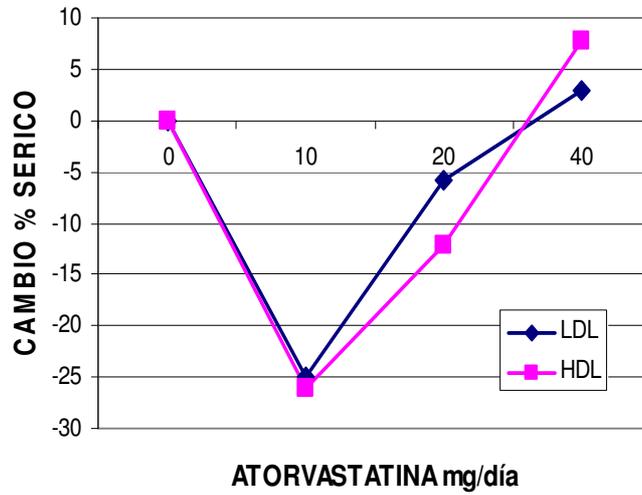


**FIGURA 15** Medición espectrofotométrica en equipo Genesys-2

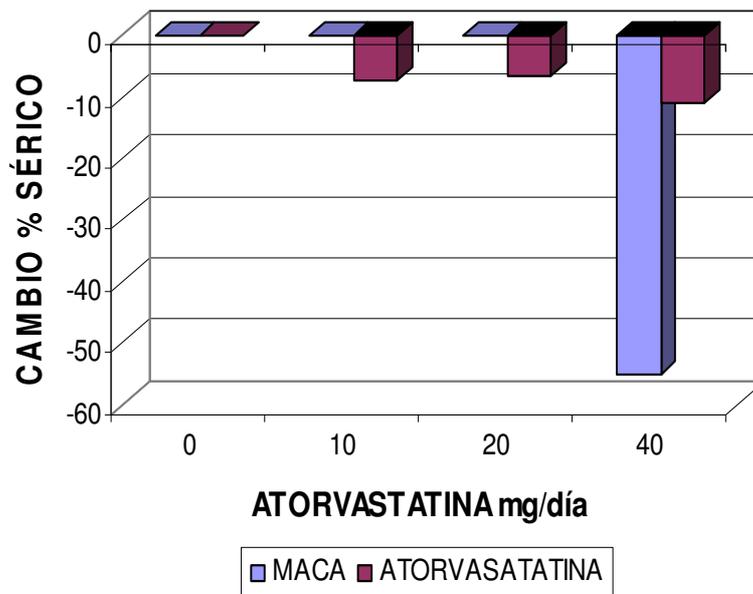


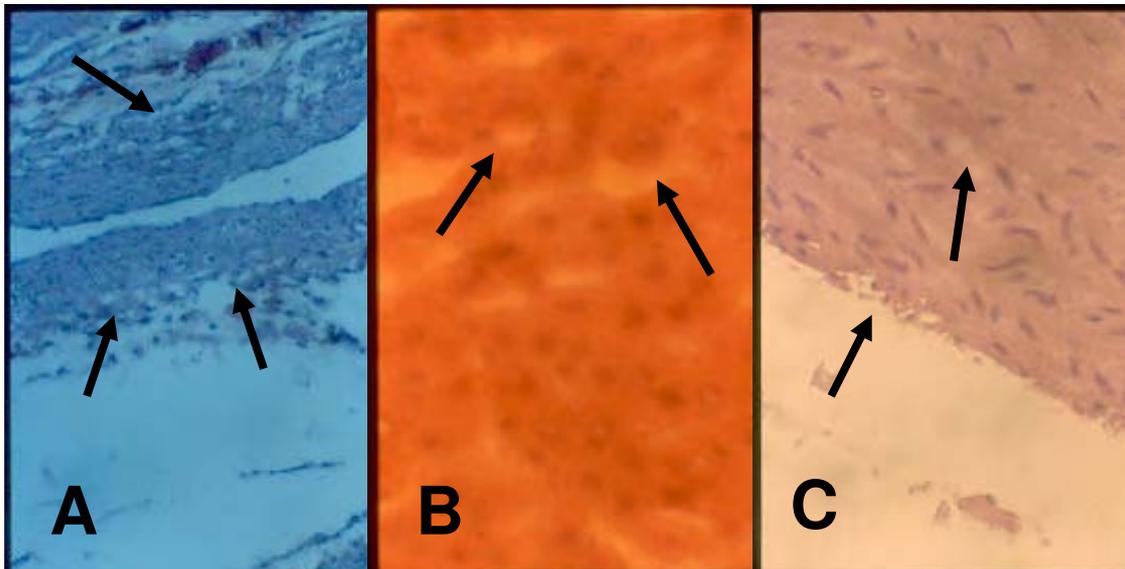
**FIGURA 16** Se muestra la administración orogástrica en rata.

**FIGURA 17**  
**EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE ATORVASTATINA SOBRE LOS NIVELES DE LDL Y HDL**



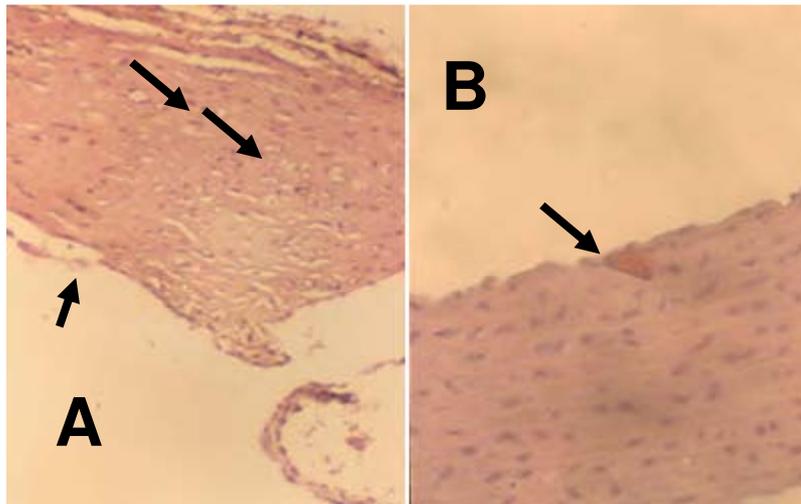
**FIGURA 18**  
**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ATORVASTATINA O HARINA DE MACA, SOBRE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS**



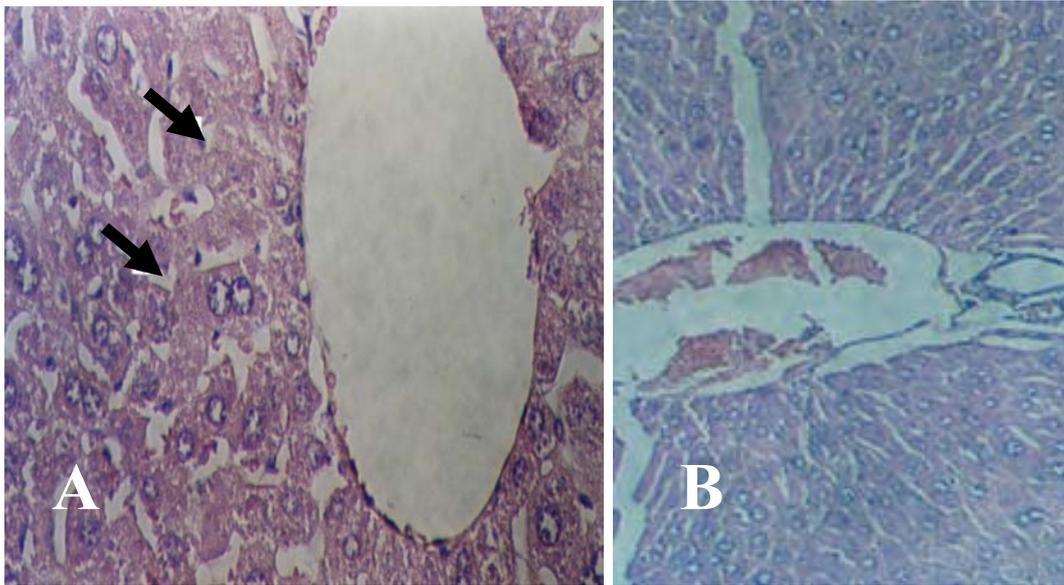


**FIGURA 19 CORTE HISTOLÓGICO DE AORTA DE RATA, CON COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA. (A y B)** Corte de aorta del grupo hipercolesterolémico que recibió maca ecotipo amarillo,mostró infiltración de grasa moderada con escasos lipófagos con pequeñas gotas de grasas intracelulares (**A** 40x y **B** 400x).

**(C)** Corte de aorta del grupo hipercolesterolémico que recibió tratamiento con atorvastatina (10mg/día), las flechas señalan un leve daño endotelial y acumulo de grasa intracelularmente ( estria grasa) (40x).



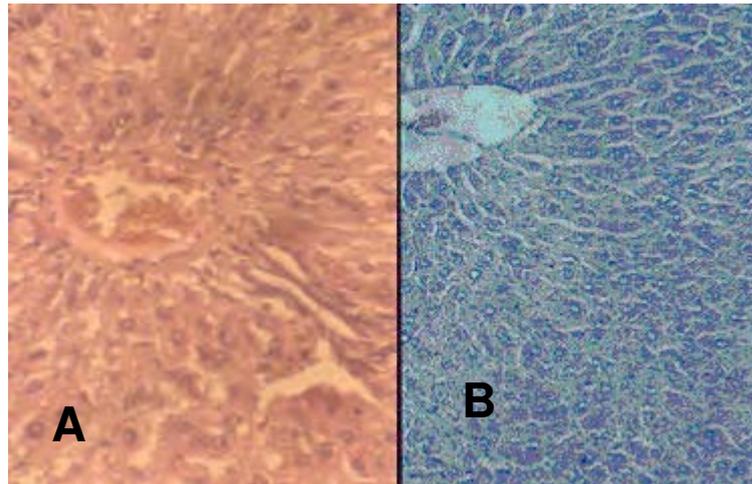
**FIGURA 20. CORTE HISTOLÓGICO DE AORTA DE RATA, CON COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA. ( A )** Corte de aorta del grupo hipercolesterolémico mostró alteración del endotelio vascular y las flechas señalan el acumulo de cristales de colesterol (estrías grasa) y lipófagos (40x).  
**( B )** Corte de aorta normal, observándose células endoteliales intactas (40x)



**FIGURA 21. CORTES HISTOLÓGICOS DEL TEJIDO HEPÁTICO TEÑIDOS CON LA TÉCNICA H/E**

**(A)** tejido hepático del grupo hipercolesterolémico + maca (500mg/día) presentó una leve desorganización del parénquima hepático, las flechas señalan escasas figuras apoptóticas (400x).

**(B)** Cortes de tejido hepático del grupo hipercolesterolémico que recibió atorvastatina (10mg/día), mostró hepatocitos con infiltración grasa intracitoplasmática con una tendencia a una esteatosis incipiente (40x).



**FIGURA 22. CORTES HISTOLÓGICOS DEL TEJIDO HEPÁTICO TEÑIDOS CON LA TÉCNICA H/E**

**(A)** Cortes de tejido hepático del grupo hipercolesterolémico, el tejido mostró desorganización de la arquitectura hepática, vacuolas cargadas de grasas y esteatosis avanzada (40x).

**B)** Tejido hepático de grupo control negativo mostró tejido conectivo regularmente distribuido en el parénquima hepático, formando un anillo denso alrededor de la vena hepática (40x).

## DISCUSIÓN

Existe interés de conocer en el mundo, especialmente en el científico, si el consumo de maca podría promover la salud, sobre todo en países en desarrollo donde están emergiendo enfermedades crónicas debido a que la desnutrición y el daño oxidativo son prevalentes.

Varios investigadores han realizado estudios sobre la composición química de la maca, con la finalidad de demostrar la presencia de principios activos en las raíces de *Lepidium meyenii Walp*, y de esa forma explicar las multifunciones farmacológicas de este hipocótilo (Dini y Col., 1994; Yu y Jin, 2006 y Valentová y Col., 2006).

El presente estudio es el primero en evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante de tres tipos de extractos de maca (acuoso y etanólico) mediante diferentes métodos.

Estudios realizados por Sandoval y Col., (2002), en extracto acuoso de maca hervida (ecotipo amarillo) demostraron mediante diferentes métodos la capacidad antioxidante como la del DDPH, captación del peroxinitrito (TRAP), captación del radical peroxilo y la protección de la deoxirribosa contra el radical hidroxilo. Esta capacidad fue comparada con el té verde (*Camellia sinensis*) colectada en Tingo María, Perú. Los investigadores concluyeron que la maca presenta la capacidad de eliminar radicales libres y proteger a las células contra el daño oxidativo.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Sandoval y Col., (2002) que indica que la maca tiene la capacidad de capturar radicales libres; con la diferencia de que en el presente trabajo se emplearon tres tipos de extractos: acuoso (hervido diez minutos y no hervido) y el etanólico (70%) del ecotipo amarillo. Sin embargo, es importante mencionar que el extracto hervido es la forma más común de

consumo de las personas de la región andina, y en especial de la **maca amarilla**, que es la que consumen diariamente como parte de su dieta. Razón por la cual se escogió este ecotipo por ser el de mayor consumo y el de mayor producción agrícola.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de maca, fue investigada por medición de su capacidad de capturar el radical DDPH. Como muestra la Figura 11. c la maca (1 a 20 mg/ml) capta al DDPH (100  $\mu$ M) en una forma dosis dependiente y con  $IC_{50} = 10$  mg/ml.

El valor inhibitorio para el extracto acuoso sin hervir al 50% fue de 0.8 mg/ml, que es bastante similar al hallado por Sandoval pero en extracto acuoso hervido (0.61 mg/ml).

Al analizar los resultados podemos concluir que el extracto acuoso de maca hervida presenta  $IC_{50} = 0.56$  mg/ml, que es ligeramente menor que la hallada por Sandoval empleando el mismo tratamiento. Los resultados obtenidos permiten inferir que cuanto menor la concentración el  $IC_{50}$  de la muestra, mayor es la capacidad de capturar los radicales libres.

La actividad antioxidante de la planta se complementó midiendo su capacidad para reducir el  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ , monitoreando la formación de un complejo coloreado (reacción tipo Fenton).

La capacidad reductora de un compuesto sirve como un importante indicador de su actividad antioxidante potencial. La presencia de agentes reductores tales como moléculas antioxidantes en las muestras a investigar, causan la reducción de  $Fe^{+3}$ / complejo ferricianuro a la forma ferrosa. Por lo tanto,  $Fe^{+2}$  puede ser monitoreado siguiendo la formación de Azul de Prusia a 700nm.

La Tabla 1 ilustra el poder reductor de los extractos acuosos y etanólico probados entre 5 a 30  $\mu$ g/mL, comparados con el ácido ascórbico como estándar en la misma concentración. Muchos autores sostienen que la actividad antioxidante de algunos extractos polares es debida, al menos en

parte, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por donación de protones (capacidad secuestrante de radicales libre), o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones). Al correlacionar la actividad antioxidante entre los tres extractos, se observa que hay mayor poder reductor en el extracto acuoso de harina de maca, hervido o sin hervir que el etanólico, esta reacción es dosis dependiente y guarda relación con la capacidad antioxidante demostrada por DPPH.

Los polifenoles y flavonoides son antioxidantes no enzimáticos que rompen la cadena en la fase lipídica bloqueando los RL en las membranas y las lipoproteínas evitando o previniendo de esa manera la peroxidación lipídica. Son elementos principalmente exógenos, responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos. Limpian el plasma de oxiradicales capturándolos y evitando las reacciones en cadena. Conociendo esta actividad biológica, se determinó la concentración de polifenoles y flavonoides en los tres extractos y se utilizó quercitina y pirogalol como estándares.

La cantidad total de fenoles hallados en la investigación realizada, varió en los diferentes extractos acuosos de maca sin hervir, hervido y en el etanólico entre 157.47, 143.11, 67.3 mg de pirogalol/g de materia seca respectivamente. Respecto al contenido de flavonoides se observó en los extracto acuoso sin hervir, acuoso hervido y etanólico, 93.4, 96.68 y 30.12% respectivamente. Es importante resaltar que el extracto acuoso sin hervir mostró mayor porcentaje de fenoles y flavonoides, que ha sido también observado en otros tipos de plantas (Kuskoski, 2005 y González de Mejía, 2003)

Recientes reportes señalan que existe una correlación positiva entre la presencia de fenoles y la capacidad antioxidante de las plantas, los resultados encontrados muestran la misma correlación para el caso del ecotipo amarillo (Wang y Col.; 2006, Parejo y Col.; 2002 y Arroyo y Col., 2007).

Es conocido que la acción antioxidante de los fenoles, consiste en secuestrar ERO; entre los metabolitos más reconocidos se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos y taninos (Bandonien y Murkovicub, 2002, González de Mejía, 2003 y Ganzera y Col.;2002), dado que el análisis de la maca en la presenta investigación, reporta contenido de fenoles y flavonoides, esta seria una de las razones por las cuales tiene poder antioxidante.

Se postula que los polifenoles presentes en plantas, (por ejemplo uvas, té verde) cumplen una función antioxidante y que su actividad biológica se le atribuye a la presencia de anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos que les permitirá actuar como donadores de hidrógeno o electrones, o atrapadores de radicales libres (Murillo, 2007, Hernández y Col.; 2004 y Hassing y Col.; 1999)

En el extracto acuoso de maca sin hervir se demostró una mayor concentración de fenoles y de flavonoides que en el extracto acuoso de maca hervida y que en el etanólico, esto permite aseverar que los fenoles totales y flavonoides de la maca son más solubles en un solvente polar como el agua.

Muchos compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios donando un átomo de hidrógeno rápidamente a un radical lipídico, formando un nuevo radical (fenoxil) más estable que el primero, deteniendo así la fase de propagación de la oxidación (Londoño y Col., 2006); sin embargo, esta capacidad estabilizadora de radicales libres está determinada no solo por la presencia de la función fenólica, si no por una serie de hechos estructurales que favorecen el proceso, entre ellos la presencia de grupos voluminosos donadores de electrones unidos a un anillo resonante, lo que confiere mayor capacidad de estabilización del radical fenoxil y disminución de la energía del enlace O-H, posiblemente este sea el mecanismo de acción antioxidante de la maca.

Se demostró que en particular, uno de los subgrupos de fenoles: los flavonoides presentan actividades antioxidantes ya que son excelentes

dadores de electrones o hidrógeno con la formación de radicales intermedios relativamente estables. Este comportamiento está relacionado con la capacidad de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar los radicales libres (Agostini y Col., 2004). Los extractos de maca obtenidos y procesados en reacciones de capacidad captadora de hierro tuvieron este comportamiento.

Investigaciones realizadas por Avello y Suwalsky (2006) con extractos de las hojas de *Ugni molinae* Turcz, conocida como Murtila (planta chilena, utilizadas por los pueblos nativos para tratar la diarrea y disentería) demostraron su capacidad antioxidante, así mismo estudios realizados por (Rubilar y Col., 2006), aislaron fenoles, compuestos que se caracterizan por tener propiedades antioxidantes y bajas toxicidades y que podrían ser utilizados con fines preventivos frente al estrés oxidativo.

Es intrínsecamente difícil evaluar los efectos médicos de antioxidantes polifenólicos específicos, ya que hay un número muy grande de compuestos individuales incluso en un solo alimento. Por ejemplo, se sabe que en el vino tinto hay más de sesenta flavonoides diferentes, aquellos vinos que son obtenidos por maceración tradicional contienen de dos a tres gramos de esta molécula por litro.

Los compuestos fenólicos, son componentes importantes de la dieta humana, se estima un consumo promedio en países europeos en 23 mg/día, al observar la concentración de fenoles de la harina de maca estudiada del extracto acuoso esta fue de  $157 \pm 35.3$ , mg/g, lo que significa que basta consumir 0,180g/día para igualar el consumo promedio de los europeos.

Por los antecedentes presentados y por nuestros resultados podemos afirmar que la capacidad antioxidante de maca es mayor en el extracto acuoso sin hervir que en el etanólico y que la acción biológica de estos extractos se relacionaría con la presencia de fenoles y flavonoide entre otros componentes.

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por RL que causa la degradación de los lípidos, siendo en particular a nivel de

las membranas celulares. Este proceso se relaciona con numerosas alteraciones patológicas, procesos inflamatorios, toxicidad hepática causada por xenobióticos, trastornos vasculares, aterosclerosis y envejecimiento (Finkel, T. y Holbrook NJ, 2000).

Los métodos para determinar los niveles de peroxidación lipídica en membranas biológicas cuantifican distintos productos a lo largo del proceso peroxidativo y se pueden clasificar midiendo la disminución del contenido de ácidos grasos poliinsaturados inicial, aparición de dienos conjugados, consumo de oxígeno, generación de productos intermedios o finales del proceso degradativo como: hidroperóxidos lipídicos, alcanos, **malonildialdehído** (Antolovich y Col.; 2002).

Estudios realizados por Oré y Col., (2001) revelaron que la administración de una dieta rica en colesterol (3%) a animales de experimentación, durante tres meses produjo un incremento de la peroxidación lipídica (TBARS-MDA) (58%) en suero respecto al grupo control, presentando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en la investigación, muestran también un incremento de los niveles del complejo TBARS-MDA en un 76% en el grupo hipercolesterolémico (control positivo) respecto al grupo control (control negativo) ( $P < 0.05$ ). Al comparar los valores de este complejo en el control positivo (hipercolesterolémico) con el grupo experimental también hipercolesterolémico que recibió harina de maca amarilla produjo una reducción de un 16.7% ( $p < 0.05$ ).

Investigaciones realizadas por de Arroyo y Col., (2007) en animales hipercolesterolémicos que recibieron durante dos meses extracto hidroalcohólico de maíz morado (200, 500 y 1000mg/ Kg de peso), mostraron reducción de los niveles de TBARS-MDA, indican además, que la respuesta es dosis dependiente y que es probable que la presencia de fenoles en el maíz morado sea el responsable del efecto antioxidante y también de la protección de las arterias; de manera semejante podría estar presentándose este efecto en la maca.

Los antioxidantes exógenos son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la liperoxidación, dentro de este grupo están las vitaminas E, C y beta caroteno, también están los flavonoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico más abundante; de estos compuestos en los cuatro ecotipos evaluados de harina de maca contiene considerables niveles de vitamina C, a ello también se le puede atribuir sus propiedades antioxidantes.

En el presente estudio, cuando se administró a los animales hipercolesterolémicos harina de maca de los ecotipos amarillo, negro, rojo y morado se observó un incremento de vitamina C de un 81.7%, 53.8%, 14.4% y 32.7% respectivamente, comparado con el control positivo (hipercolesterolémico). Respecto a los niveles de la vitamina A el incremento no fue muy importante como el observado con la vitamina C, solo se obtuvo una elevación máxima de 7% en el grupo que recibió harina de maca amarilla respecto al grupo hipercolesterolémico.

Estudios realizados *in vitro* con diferentes tipos de jugos de cítricos en los que existe vitamina C, Lodoño y Col., (2006), encontraron una buena protección de la oxidación de la LDL. En los animales del presente trabajo que recibieron harina de maca la concentración de Vitamina C sérica fue mayor de los controles, lo que aseguraría una protección de las LDL contra el daño oxidativo.

Así mismo, un estudio publicado el 28 de mayo de 2002 en la prestigiosa revista científica The Lancet asegura que consumir 5 veces por día frutas y vegetales aumenta los antioxidantes en la sangre y disminuye la presión arterial (John y Col., 2002).

Estudios ecológicos y epidemiológicos han sugerido que la ingestión abundante de frutas y vegetales se asocia con una reducción del riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares y para lograr estos beneficios se ha propuesto suplementar las dietas con la ingestión de

cantidades altas de vitaminas antioxidantes. Sin embargo, estudios sobre este tipo de dieta con vitaminas antioxidantes, no han logrado sostener esta hipótesis. La evidencia actual muestra que es beneficioso ingerir más frutas y verduras, y no el uso de suplementos vitamínicos.

El perfil lipídico, son un conjunto de pruebas de laboratorio que muestran el estado metabólico de los lípidos mediante el estudio de las lipoproteínas y los triglicéridos. Estos componentes plasmáticos, varían y se asocian a diversas enfermedades como dislipidemias, aterosclerosis, diabetes, síndrome metabólico; además la alteración de este perfil esta asociado a accidentes cardio y cerebro vascular, infarto agudo de miocardio y otras patologías relacionadas a la circulación. Las lipoproteínas que se cuantifican y luego se construyen índices de riesgo son la HDL, LDL y la apolipoproteína a; además la concentración de colesterol total y triglicéridos son otros indicadores usados en la actualidad para realizar un diagnóstico del metabolismo de lípidos. Estos metabolitos han sido estudiados en los diferentes grupos de estudio.

Como se ha descrito en los resultados, hemos demostrado que el consumo maca amarilla (2 meses), en la forma de harina en animales con dieta hipercolesterolémica, produjo una reducción de los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos (ver Tabla 8 y 14). Cuando observamos los resultados obtenidos con el tratamiento de la atorvastatina y se comparó con los resultados de maca, se observaron resultados de comportamiento similar, es decir que la maca estaría produciendo resultados semejantes a los producidos por el fármaco que actualmente es empleado en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

En el caso del consumo de maca amarilla este tratamiento redujo sólo un 7% de los niveles de HDL en comparación con el grupo de animales que recibió la atorvastatina (10 mg/día) que causó una reducción del 25%. Con estos resultados se puede afirmar que el consumo de maca estaría protegiendo al organismo de las alteraciones del colesterol, mediante un adecuado transporte reverso de esta molécula.

Estudios realizados por Arroyo y Col., 2007, demostraron que el consumo crónico de maíz morado en la forma de extracto hidroalcohólico atomizado produjo una reducción de los niveles de colesterol total y no se demostró en forma evidente su efecto positivo sobre los triglicéridos y el colesterol HDL, esto se pudo deber al limitado tamaño de la muestra y a la variabilidad de los resultados.

La actividad hipocolesterolemica observada podría explicarse con lo reportado por Ravi y Col., 2005, quienes demostraron la actividad hipolipemiente del extracto *Eugenia jambolana* lo relacionan con su alto contenido en flavonoides, glucósidos y compuestos fenólicos; metabolitos secundarios encontrados también en el extracto de *Zea mays L.*

También hallamos fenoles y flavonoides en extracto acuoso e hidroalcohólico de maca (50mg/ml), entonces podríamos asumir que la presencia de fenoles en la maca podría ser el responsable de la reducción del colesterol, LDL y triglicéridos.

Numerosas investigaciones han evaluado la actividad antioxidante ya sea enzimática y no enzimática de los flavonoides frente a los RL generados durante procesos aeróbicos. Diversos autores coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo de fenilo B son más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; como sucede con la quercetina (Martínez y Col., 2002). Al mismo tiempo se evidencia que las agliconas de los flavonoides se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos (Pérez, 2004).

Uno de los principales mecanismos que explicaría el poder de los polifenoles como excelentes antioxidantes es la protección a las LDL del daño oxidativo y su acción como antioxidante está relacionada no sólo con su estructura química sino que también con su localización en la partícula. También pueden actuar como potentes inhibidores de la oxidación de las LDL, esta acción cumpliría un papel protector de enfermedades crónicas que

actualmente son la preocupación principal de la salud pública a nivel mundial.

Otra hipótesis es que los flavonoides pueden reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y cáncer, dos de los principales problemas sanitarios del mundo occidental (Álvarez y Orallo, 2003).

Martínez-Valverde y Col. (2000) y Pasten, C y Grenett, H (2006) refieren el posible mecanismo antioxidante de los polifenoles

- Reducción de la inflamación, como en la enfermedad arterial coronaria. Hay incluso investigación médica específica sobre la mejora de la salud de los vasos sanguíneos debida a la regulación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad.
- Algunos antioxidantes de polifenol, como el resveratrol, inhiben el inicio y/o crecimiento de tumores de mama.
- Se han atribuido muchos otros efectos beneficiosos para la salud al consumo de alimentos ricos en antioxidantes polifenólicos. Entre estos efectos beneficiosos están el retraso en la aparición de arrugas en la piel.

Silagy y Col., (1994) encontraron evidencias que preparaciones de ajo pueden reducir el colesterol. Sin embargo, Kannar D, y Col., (2001) en un protocolo mejor diseñado, los datos encontrados no reportaron ningún beneficio.

Un meta-análisis sobre el ajo, que incluye 13 ensayos, encontró evidencia de reducción de colesterol en el rango de 5% comparado con placebo. (Stevinson, y Col., 2000).

Los ensayos clínicos han demostrado que los sujetos con niveles plasmáticos elevados del colesterol asociado a la LDL presentan aumento del riesgo de desarrollar enfermedad coronaria y que su reducción mediante una terapia con estatinas disminuye la morbilidad y mortalidad de los pacientes con enfermedad coronaria establecida o sin ella; al tener la maca también estas propiedades podemos sugerir su consumo de manera que coadyuve al tratamiento y mejore la calidad de vida de los pacientes con dislipidemias.

La atorvastatina es un fármaco hipolipemiante, se ha sugerido que es más potente que los demás del grupo como la simvastatina; a las mismas dosis reduciría más las concentraciones de colesterol total, LDL y triglicéridos. Es bastante recomendada para el tratamiento de pacientes que tienen antecedentes de cardiopatías isquemia, también para diabéticos con dislipidemias.

Los resultados del tratamiento con maca ecotipo amarilla, muestran que tiene acción hipocolesterolemica e hipotrigliceridémica, por ello trasciende la importancia de su consumo como parte de la dieta, ello conlleva a recomendar, educar a la población para que cambie hábitos alimenticios.

Tomas y Col., (2004), realizaron estudios con 21 pacientes dislipidémicos, pero sin aterosclerosis, que recibieron un tratamiento de atorvastatina (20mg/día), a corto plazo (3 meses) y observaron una mejora del perfil lipídico, así mismo la función microvascular coronaria.

Larosa y Col., (2005), efectuaron una investigación con 10,001 pacientes con enfermedad coronaria estable, durante 5 años, compararon diferentes dosis de atorvastatina 80mg/día *versus* 10mg/día y encontraron que la dosis mayor reduce los niveles de colesterol en especial los niveles de LDL.

Respecto a los índices CT/HDL y LDL/HDL que indican relación de riesgo de enfermedades cardiovasculares, se observó una disminución de los grupos que recibieron la estatina y la maca pero sin ser significativa.

Cuando se comparó, el control positivo (ratas hipercolesterolemicas) con el grupo que recibió maca (500mg/día) y la atorvastatina (10mg/día) se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de colesterol, LDL, y de triglicéridos con respecto al control positivo. Igual comportamiento se observó en la relación de riesgo del grupo que recibió maca y la atorvastatina (10mg/día) ( $p < 0.05$ ). Se debe resaltar que en el grupo que

recibió maca, los niveles de HDL solo se redujeron un 7% con respecto al control negativo, y que con la estatina se produjo mayor reducción.

Las estatinas probablemente aumentan el número o la capacidad de los receptores LDL, incrementando el aclaramiento de lipoproteínas que contienen apo B o apo E. Sin embargo, el mecanismo de estos fármacos debe ser más complejo de lo que se pensaba originalmente. Así, se considera que disminuyen la producción hepática de apo B 100 y alterando la posterior producción de lipoproteínas que contienen apo B 100 (VLDL, IDL y LDL).

En el presente estudios se ha encontrado una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del fibrinógeno en los grupos tratados con la atorvastatina (10mg/día) y maca (500mg/dl) con respecto al control positivo; el grupo que recibió la maca mostró una disminución del (48.8%), en cambio en el grupo tratado con atorvastatina se produjo una disminución del 40.8%. Estos resultados inducen a pensar que la maca produciría una mayor protección frente a problemas cardiovasculares.

Pérez y Col., (2003) realizaron estudios con diabéticos tipo 2, llegando a la conclusión que existe una asociación entre el aumento de fibrinógeno y el riesgo de complicaciones macrovasculares; es conocido que el depósito de fibrinógeno puede iniciar la aterogénesis y puede contribuir al crecimiento de las plaquetas.

El fibrinógeno y sus metabolitos parecen provocar daño y disfunción endotelial. Muchas lesiones ateroscleróticas tienen grandes cantidades de fibrina en forma de trombos murales en la superficie de las placas, en capas dentro de la cápsula fibrosa, en el centro lipídico o distribuida en forma difusa.

Una vez en la íntima arterial, la fibrina estimula la proliferación celular. Los productos de degradación de la fibrina pueden estimular la mitogénesis y la síntesis de colágeno, atraer leucocitos y alterar la

permeabilidad endotelial y el tono vascular. En estadios avanzados la fibrina puede unirse a LDL y favorecer la acumulación de lípidos.

Respecto a los niveles de peroxidación, es importante resaltar que la administración de maca y de estatina mejoran las defensas antioxidantes, especialmente cuando se evaluó los niveles de TBARS-MDA (lipoperoxidación) observándose una reducción significativa de ese parámetro.

En la actualidad solo se ha realizado una investigación con extracto hidroalcohólico de maíz morado observándose una disminución de este complejo en 56.4% ( $p < 0.01$ ) en relación al control positivo (Arroyo y Col., 2007). También hallamos una disminución de un 30.2% al compararlo con el grupo hipertcoesterolémico.

Al evaluar los niveles de vitamina C, mostró un incremento (30.2%) en el grupo que recibió maca al compararlo con el control positivo. Estos resultados muestran que la maca podría mejorar las defensas antioxidantes.

También asumimos con los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, que la maca se comporta como un excelente antioxidante y que protegería a las células del daño oxidativo causado por la producción de RL que formamos diariamente. Esta capacidad anti estrés oxidativo también la ha sido demostrado en esta investigación al analizar los resultados de la prueba TBARS-MDA obtenidas.

Los resultados bioquímicos estudiados demostraron acciones de protección de la harina de maca ecotipo amarillo al daño oxidativo, lo que conlleva una reducción de LDL, reducción de triglicéridos, colesterol total y fibrinógeno, todo ello conduce a pensar en una disminución de la formación de placas de ateroma a nivel arterial lo que fue confirmado en los cortes histológicos de la aorta.

En las láminas histológicas mostraron que la presencia macrófagos en áreas con el endotelio intacto o en buen estado, esto sugiere que

además de la forma clásica de formación de las placas ateromatosas, estas también podrían formarse a partir de la irrigación propia de las grandes arterias es decir desde la *vasa vasorum*, capilares que nutren a los tejidos medio e íntimo de las paredes arteriales, por lo tanto no sería únicamente desde la luz del vaso hacia la capa media sino también desde la adventicia hacia la capa media; en el primer caso, depende del daño endotelial, mientras que en el segundo dependería de la concentración de colesterol y sus fracciones (Hayden y Tyagi 2004).

Por esta razón se busca alternativas de origen vegetal que puedan ser una excelente fuente de antioxidantes, energizante, y que se incorporen como parte de la dieta diaria y así evitar y/o reducir el daño oxidativo de nuestro organismo que está expuesto constantemente a la generación de ERO, los resultados obtenidos indican que la maca puede ser un alimento que contiene moléculas que protegerían del daño oxidativo.

Los posibles efectos colaterales que causan las estatinas para el tratamiento de dislipidemias se relacionan con hepatotoxicidad y miopatías, dosis dependiente y en función al tiempo de consumo, estas drogas son usadas con gran éxito para el tratamiento de dislipidemias y las posibles complicaciones derivadas del incremento del colesterol y sus fracciones. En la investigación, se observó los efectos provocados por el tratamiento de atorvastatina, como se ha referido en los resultados, hubo elevación de las enzimas marcadoras hepáticas como TGO, TGP, GGP y fosfatasa alcalina (PAL), esta tendencia también se evidenció en los cortes histológicos del hígado.

Estudios en conejos hipercolesterolémicos (Brito, 2003) tratados con atorvastatina a una dosis de 2.5 a 5 mg/ Kg / día, concluyeron que su administración redujo los niveles séricos de colesterol y triglicéridos; además disminuyó el número de lesiones en la íntima de las arterias, estos resultados sugieren que la atorvastatina puede ejercer un rol protector al disminuir los niveles de óxido nítrico en los conejos hipercolesterolémicos, siendo esta molécula considerada como un mediador inflamatorio potente en la uveítis inducida por endotoxinas y en el proceso de aterosclerosis.

Respecto a los niveles séricos de las transaminasas (TGP y TGO), PAL y GGT se incrementaron tras la administración del fármaco, sin embargo al administrar la harina de maca ecotipo amarillo a los animales hipercolesterolémicos produjo un menor incremento.

Stojakovic, y Col., (2007) realizaron estudios con 18 pacientes que presentaron cirrosis biliar primaria con hipercolesterolemia, después de 4 semanas de tratamiento con 10 mg, 20 mg y 40 mg de atorvastatina en combinación con ácido ursodeoxicólico; los valores de las transaminasas mostraron un aumento importante (por encima del 100%) con dosis de 10 y 40 mg. En cuanto a los valores de la PAL se incrementaron en casi un 50% a las mismas dosis y los valores de GGT no aumentaron.

Andrinolo, y Col. (2008) realizaron estudios de exposición subcrónica a Myc-LR (microcystin LR) (aislado de cianobacterias que están presentes en cuerpos de agua que los humanos podemos consumir) administrando dosis subletales de 25µg/kg cada 48 hs. durante un mes, seguido de períodos de 1 y 2 meses sin exposición a la toxina, evaluaron los daños a nivel hepático y renal en los animales tratados (21 ratones), así como la posibilidad de reversión de los daños. Sus resultados mostraron incremento de PAL que revierte hasta valores normales después de 60 días sin toxina. Respecto a la TGO se observó un aumento significativo durante los primeros 30 días de recuperación, que luego baja hasta alcanzar valores normales.

Los datos obtenidos de marcadores séricos enzimáticos reflejan un daño hepático fue corroborado con los estudios histopatológicos, en el que se hace evidente una lesión del tejido hepático en ratas tratadas con atorvastatina, donde se observó hepatocitos con infiltración grasa intracitoplasmática con una tendencia a una esteatosis incipiente, una gran desorganización del tejido hepático: picnosis, cariólisis y zonas apoptóticas (anatosomas). En cuanto al grupo tratados con maca, el parénquima hepático mostró algunas figuras apoptóticas, que son expresión de una etapa inicial de adaptación frente a un estímulo agresor, en este caso el colesterol elevado en la dieta; esto también fue observado por Torres,

(2003), que al administrar un extracto acuoso de maca (10 g/Kg) (toxicidad aguda) observó una desorganización del parénquima hepático y engrosamientos de la trabéculas de hepatocitos, que son manifestaciones que el hígado posee por su capacidad regenerativa frente agentes agresores de tipo reversible.

Respecto al grupo que recibió la dieta hipercolesterolémica, el tejido hepático mostró la presencia de vacuolas cargadas de grasas, desorganización de la arquitectura hepática y esteatosis avanzada, en el caso del grupo control negativo, los hepatocitos mostraron un aspecto normal.

Los resultados obtenidos induce a plantear un posible mecanismo de acción de la maca como agente hipolipemiante, y que produciría efectos colaterales no dañinos a nivel hepático en menor grado que los causados por la atorvastatina.

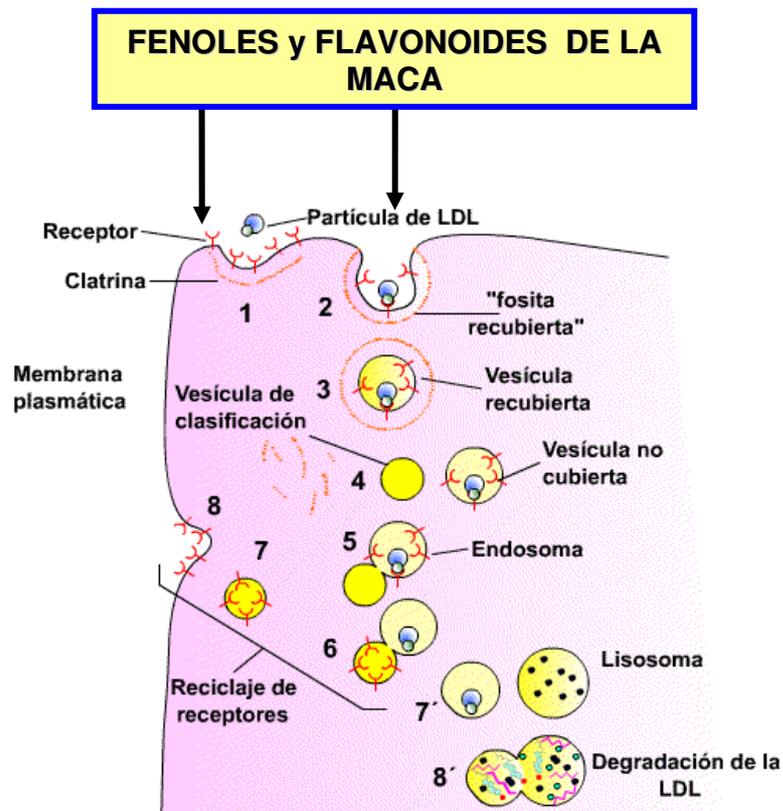
## **POSIBLE MECANISMO ANTIOXIDANTE DE LA HARINA DE "MACA"**

A partir de los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* se intentará primero postular el posible mecanismo de acción de la maca frente a radicales libres (DPPH), (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fe<sup>+3</sup>) y la posibilidad que la presencia de los fenoles y flavonoides favorecen su actividad antioxidante, actuando en forma sinérgica para cumplir eficientemente su función como **antioxidantes exógenos**. Además se ha intentado representar gráficamente las posibles interacciones en el metabolismo de las lipoproteínas (LDL, HDL) y triglicéridos.

### **El posible mecanismo sobre la capacidad antioxidante de la maca se puede producir a dos niveles**

1. Bloqueando la formación de aquellas especies reactivas derivadas del oxígeno, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, predecesores del **radical hidroxilo**, considerado como el más potente oxidante entre las EROS.
2. Quelando metales de transición como el cobre y el hierro, los cuales colaboran en la formación de EROS a través de las reacciones de Fenton-Haber-Weiss, que protegería a la célula del daño oxidativo.

La acción sinérgica de ambos mecanismos podría explicar los valores relativamente bajos obtenidos en la IC<sub>50</sub> y altos en poder reductor alcanzados y en especial el alto contenido de fenoles y flavonoides hallados en el estudio. De otra parte, los compuestos de naturaleza fenólica juegan papel importante en los procesos de **oxidación lipídica** y se les asocia con la actividad antioxidante.



**Figura 23** Muestra el posible efecto de la administración de la maca (fenoles y flavonoides) en el metabolismo de la LDL: favoreciendo la endocitosis de la LDL y su metabolismo (1 a 5) y su degradación con la participación de los lisosomas (7 a 8). Finalmente el reciclaje de los receptores de la LDL que favorece la endocitosis de la LDL, dejando el colesterol en el interior de la célula para ser esterificado por la enzima LCAT (Lecitin Colesterol Acil Transferasa).

## CONCLUSIONES

- 1.-** El extracto acuoso de harina de maca del ecotipo amarillo mostró una mayor capacidad antioxidante *in vitro* que el extracto etanólico.
- 2.-** La presencia de fenoles y flavonoides en los extractos acuoso y etanólico del ecotipo amarillo de maca está relacionada con su capacidad antioxidante.
- 3.-** El ecotipo de maca amarilla mostró mayor efecto antioxidante e hipercolesterolémico en ratas hipercolesterolémicas.
- 4.-** La administración de harina de maca amarilla a ratas que recibieron una dieta hipercolesterolémica, ejerció efecto protector contra el daño oxidativo, al disminuir significativamente los niveles de TBARS- MDA e incrementar la concentración de la vitamina C.
- 5.-** El tratamiento con harina de maca amarilla a ratas hipercolesterolémicas produjo una reducción significativa de los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos.
- 6.-** El tratamiento de ratas hipercolesterolémicas con harina de maca amarilla redujo los niveles de fibrinógeno.
- 7.-** La administración tanto de atorvastatina como de harina de maca amarilla produjo una igual inhibición de la enzima hepática Hidroximetil glutaril CoA reductasa.
- 8.-** El tratamiento a ratas hipercolesterolémicas con harina de maca amarilla produjo disminución de las enzimas séricas marcadoras de daño hepático: fosfatasa alcalina, glutámico oxalacético transaminasa, glutámico pirúvico transaminasa y gammaglutamil transferasa .
- 9.-** La administración de harina de maca ecotipo amarillo a ratas hipercolesterolémicas ejerció efecto protector a nivel hepático y tejido aórtico verificado histológicamente.

## RECOMENDACIONES

- 1.-** Es necesario que se realicen más investigaciones para poder dilucidar el posible mecanismo de acción de la maca en la protección contra el daño oxidativo que sufre el organismo diariamente.
- 2.-** Es importante que se diseñen investigaciones para identificar los principios activos contenidos en los extractos estudiados involucrados en la actividad hipolipemiente y antioxidante que mostró la harina de maca ecotipo amarillo.
- 3.-** Siendo la maca un producto natural, podría ser recomendado como suplemento antioxidante biológico y como agente hipolipemiente por su baja toxicidad a nivel hepático.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ahmed, AJ. 2003. Maca- Stimulin libido Redux. Total Health 25(2): 15-16.
2. Álvarez, E. y Orallo F. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente el cáncer. OFFARM 22(10): 130-140.
3. Assmann, G. y Nofer JR. 2002. Atheroprotective Effects Of High-Density Lipoproteins. Annual Review of Medicine 54: 321-341.
4. Aviram, M.; Rosenblat, M.; Gaitini, D.; Nitecki, S.; Hoffman, A.; Dornfeld, L. y Col. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clin Nutr 23(3): 423-33.
5. Agostini, L.; Morón-Jiménez, M.; Ramón, A. y Ayala-Gómez, A. 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. ALAN 54(1): 89-92.
6. Andrinolo, D.; Sedán, D.; Telese, L.; Aura, C.; Masera, S.; Giannuzzi, L.; Marra, A y De Alaniz MJT. 2008. Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. Toxicon 51:457-467.
7. Antolovich, M.; Prenzler, PD.; Patsalides, E.; McDonald, S. y Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst 127: 183-198.
8. Antúnez de Mayolo R. S. 1977. La nutrición en el antiguo Perú. III Congreso Peruano. El hombre y la cultura andina. Segunda serie Tomo V.
9. Arroyo, J.; Ruez, E.; Rodríguez, M.; Chumpitaz, V.; Burga, J.; De la Cruz, W. y Valencia J. 2007. Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays* L) en ratas hipercolesterolémicas. Rev Perú Med Exp Salud Pública 24(2): 157-62.
10. Avello, M. y Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494: 161-172.
11. Bahram, A.; Dilshad, K.M.D.; Shanil, M.S.; Celindo, L.D. y Col. 1998. Consumption lowers serum LDL-cholesterol and lipoprotein (a) concentration post menopausal women. Nutrition Res 18: 1203-1214.

12. BalicK, M.; y Lee, R. 2002. Maca: from traditional crop to energy and libido stimulant. *Alternative ther in Heath Medicine* 8(3): 96-98.
13. Bandoneon, D. y Murkovicub, M. 2002. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis L.*) by using an on-line HPLC- DPPH method. *J. Biochem. Biophy: Methods:* 53(1-3), 65-70 .
14. Baquerizo, G. 1968. Estudio químico bromatológico del *Lepidium meyenii* Walp (Maca) y del *Aiphanes* var. *Deltoidea* Burret ("Shica-Shica"). Tesis de bachiller en Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 35 Pp.
15. Blanco-Colio, LM.; Marín-Ventura, JL.; Muñoz-García, B. y Egido de los Ríos, J. 2004. La atorvastina disminuye la expresión de Fas y la citotoxicidad en linfocitos T humanos activados. Implicaciones potenciales en la estabilidad de la lesión aterosclerótica. *Inv Clín Farm* 1(1): 25-30.
16. Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-33.
17. Breithaupt-Grogler, K.; Lin, M.; Boudoulas, H. y Col. 1997. Protective effect of chronic garlic intake on elastic properties of aorta in the elderly. *Circulation* 96: 2649 - 2655.
18. Brito, B. 2003. Efecto de la atorvastatina, como droga inhibidora de la síntesis de colesterol sobre el desarrollo de uveítis inducido por un polisacárido en conejos. Tesis de bachiller en Ciencias Biológicas Universidad Central de Venezuela.
19. Buege, JA. y Aust, SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-10.
20. Canales, M.; Aguilar, J.; Prada, A.; Huamán, C., y Carvajal, L. 2000. Nutricional evaluation of *Lepidium meyenii* (Maca) in albino mice and their descendants. *Arch Latinoamer* 50: 126-133.
21. Castillo, P. y Lock, O. 2005. Compuestos con actividad antioxidante en la especie *Lepidium meyenii* (Walp). *Rev Soc Quím Perú* 71(4): 227-236.
22. Chacón R, G. 1961. Estudio fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San marcos. Lima. 46 Pp.
23. Chung, F.; Rubio, J.; Gonzáles, C.; Gasco, M.; y Gonzáles, G. 2005. Dose resonce effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 143-147.

24. Claus, A. 1957. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haemat* 17: 237-246.
25. Cooke, D.; Steward, WP.; Gescher, A. y Marczylo, T. 2005. Anthocyanins from fruits and vegetables- Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur J Cancer* 41(13): 1931-40.
26. Davignon, J. 2004. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 109: III39-III43.
27. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnine, P. y Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49: 347-349.
28. Elmastas, M.; Gulçin, I.; Ozturk, L. y Goké, I. 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L. ). *Asian Journal of chemistry* 17(1): 137-148.
29. Fahey, J.W.; Zalkemann, A.; y Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56(5): 51-54.
30. Fernández-Pachón, MS.; Villaño, D.; García, M.; Troncoso, A. M. 2004. Antioxidant activity of wine and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chemical Acta* 513(1) : 113-118.
31. Finkel, T. y Holbrook, NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
32. Ganzera, M.; Zhao, J.; Muhammad, I. y Khan, IA. 2002. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50(7): 988-991.
33. García, BL.; García, GL.; Rojo, D. y Sánchez, GE. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 20(3): 231-235.
34. González, C.; Rubio, J.; Gasco, M.; Nieto, J.; Yucra, S. y González GF. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 448-454.
35. González de Mejía, E. 2003. El efecto quimioprotector del té y sus compuestos. *ALAN* 53: 2-8.
36. González, GF. 2006 Maca de la tradición a la ciencia Instituto de investigaciones de la altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 230 Pp.

37. González, GF.; Miranda, S.; Nieto, J.; Fernández, G.; Yucra, S., y Rubio, J. 2005. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3(1): 5-13.
38. Halliwell, B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radic Res* 25: 57-74.
39. Hassing, A.; Liang, WX.; Schwabl, H. y Stampfli K. 1999. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses* 52: 479-481.
40. Hayden, M. y Tyagi, S. 2004. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: a malignant transformation. *Cardiovasc Diabetol* 3:1 Published on line 2004.
41. Hansson, GK. 2005. La inflamación en la patogenia de aterosclerosis y síndromes coronarios agudos. *New England Journal of Medicine* 352 (16):1685-1695.
42. Hernández, F.; Rodríguez, T. y Sánchez, M. 2004. Té verde ¿Una buena elección para prevenir las enfermedades cardiovasculares? *Arch Lationam Nut* 54(4): 380-394.
43. Jagota, SK. 1992. A new colorimetric technique for estimation of vitamin C using Folin Fenol reagent. *Anal Biochem* 127: 178-82.
44. John, JH.; Ziebland, S.; Yudkin, P. y Neil, Haw. 2002. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentration and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet* 359: 1969-1974.
45. Kannar, D.; Wattanapenpaiboon, N.; Savige, GS. y Wohlquist, ML. 2001. Hypocholesterolemic effect an enteric-coated garlic supplement. *J Am Coll Nutr* 20(3): 225-231.
46. Koscielny, J.; Klussendorf, D.; Latza, R. y Col. 1999. The antiatherosclerotic effect of *Allium sativum*. *Atherosclerosis* 144:237 - 249.
47. Kuskoski, E.; Roseane, F.; García, A.; Troncoso, G. y Col 2005. Chemical and pharmacological properties of the fruit guaraná (*Paullinia cupana*). *Vitae* Jul/Dec 12(2) 45-52.
48. Lagarda, M.; García-Llatas, G. y Farré, R. 2006. Anallysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical* 41: 1486-1496.
49. Larosa, JC.; Grundy, SM.; Waters, DD.; Shear, C.; Barter, P.; Fruchart, JC. y Col. 2005. For the Treating to New Targets (TNT) investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med* 352: 1425- 1435.

50. Lee, K.; Dabrowski, K.; Rinchar, J.; Gomez, C.; Guz, L. y Vichez, C. 2004. Supplementation of maca (*Lepidium meyenii*) tuber meal in diets improves growth rate and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) alevins and juveniles. *Aquaculture Res* 35: 215-223.
51. Lee, K.; Dabrowski, K.; Sandoval, M. y Miller, M. 2005. Activity – guided fractionation of phytochemical of maca meal, their anti-oxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Res* 244: 293-301.
52. Lee, J.; Koo, N. y Min, DB. 2004. Reactive oxygen species, aging and antioxidants nutraceuticals. *Compreh Rev Food Science and Food. Safety* 3: 21-33.
53. León, J. 1964. The "Maca" (*Lepidium meyenii*), a little-known food plant of Perú. *Economic Botany* 18: 122-127.
54. Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
55. Londoño, I.; Montoya, J.; Guerrero, G. y Col. 2006. Citrus juice inhibits low density lipoprotein oxidation: relationship between free radical scavenger activity and electrophoretic mobility. *Rev Chil Nutr* 33(3): 544-551.
56. Lopez-Fando, A.; Gómez- Serranillos, MP.; Lock, IO.; Upamayt, UP. y Carretero, ME. 2004. *Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress. *Phytochemical Analysis* 16: 463-469.
57. Marín, BM. 2002. Estudio morfológico y farmacológico de *Lepidium meyenii* Walp. "maca" tesis de Magíster en recursos Vegetales Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima. 50Pp.
58. Martín-Ventura, J.; Blanco-Colio, L.; Gómez-Hernández, A.; Muñoz-García, B.; Vega, M.; Serrano, J.; Ortega, L.; Hernández, G.; Egido, J. y Tuñón, J. 2006. El tratamiento con dosis altas de atorvastatina disminuye la inflamación en la aterosclerosis carotídea humana. *Clínica e investigaciones en arteroesclerosis* 8(1): 18-23.
59. Martínez-Flores, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. y Tuñón J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 17(6): 271-278.
60. Martínez- Valverde, I.; Periago, M. y ROS, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN* 50(1): 5-18.
61. McCollom, MM.; Villinski, JR.; Mcphail, KI.; Craker, LE. y Gafner, S. 2005. Analysis of macamides in samples of maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV- MS/MS. *Phytochemical Analysis* 16: 463-469.

62. Muhammad, I.; Zhao, J.; Dunbar, DC. y Khan, IA. 2002. Constituents of *Lepidium meyenii* "maca". *Phytochemistry* 59: 105-110.
63. Munaylla, S. 2003. Efecto de la administración de *Lepidium peruvianum* Chacón "maca" en la dieta de ratas hipocalcémicas. Tesis Químico Farmacéutico, Ayacucho, Perú.
64. Murillo, E.; Lombo, O.; Tique, M. y Méndez, J. 2007. Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE) *Información Tecnológica* 18(6): 65-74.
65. Obregón, L.; Rentarúa, IM.; y Rentarúa, EP. 2006. Maca. Planta de los Incas, maravilla de la ciencia. Instituto de Fitoterapia Americano 1º Edic. 2006. 153 Pp.
66. Olmedilla, B.; Granado, F.; Southon, S.; Wright, AJ.; Blanco, I.; Gil-Martínez, E.; Berg, H.; Corridan, B.; Rossel, AM.; Chopra, M.; Thurnham, DI. 2001. Serum concentration of carotenoids and vitamin A, E and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutri* 85(2): 227-238.
67. Oré, R.; Valdieso, R.; Arnao, I. y Suarez, S. 2001. Beneficio de la Suplementación de la Vitamina E en Ratas hipercolesterolémicas. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos* 62(1): 7-12.
68. Oré, R.; Valdivieso, R.; Ronceros, G.; Raéz, E.; Durand, J. y Huerta, D. 2004. Efectos adversos de la maca y atorvastatina en hígado de ratas hipercolesterolémicas. *Rev Soc Quím Perú* 70(1): 9-17.
69. Oré, R.; Valdivieso, R.; Oriundo, R.; Sandoval, M. y Huerta, D. 2007. Efectos de *Lepidium meyenii* Walp "maca" sobre los niveles de hormonas sexuales y órganos reproductores de ratas ovariectomizadas. *Anales de la Facultad de Medicina* 68: supl1 S27.
70. Oyaizu, M. 1986. Studies on the products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*: 44: 307-315.
71. Parejo, I.; Viladomar, F.; Bastida, J.; Roas-Romero, A.; Flerlage, N.; Burillo, J. y Codina, A. 2002. Comparason between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6882- 6890.
72. Pasten, C. y Grenett, H. 2006. Vino, fibrinolisis y salud. *Rev méd Chile* 134(8): 1040-1048.
73. Paterson, J. y Wiggins, C.S. 1954. An estimation of plasma vitamin A and the vitamin A absorption test. *J Clin Pathol* 7(1): 56-60.

74. Pedreschi, R. y Cisneros-Zevallos, L. 2007. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chem* 100(3): 956-963.
75. Pedras, MS.; Okanga, F.; Zaharia, I. y Khan, A. 2000. Phytoalexins from crucifers: Síntesis, biosíntesis and biotransformation. *Phytochemistry* 53: 161-173.
76. Pérez, P.; Triana, M.; Pantaleón, O. y Fernández, J. 2004. Fibrinógeno, dislipidemias, fibrinólisis y actividad lipolítica en pacientes diabéticos tipo 2. Relación con la obesidad. *Revista Cubana de angiología y cirugía vascular* 1: 23- 29.
77. Pérez, TG. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*; 22(1) 48-57.
78. Piacente, S.; Carbone, V.; Zapmpelli, A. y Pizza, C. 2002. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Agricultural and food Chemistry* 50: 5621-5625.
79. Pineda, A.; Salucci, M.; Lázaro, R.; Maiani, G. y Ferro-Luzzi, A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr* 13(2): 104-111.
80. Pita, G.; Matos, C.; Serrano, G. y Col. 2007. Niveles de vitaminas antioxidantes en plasma de pacientes con infarto de miocardio. *Rev Cubana Invest Bioméd* 26: 1-6.
81. Rapola, J.; Virtamo, J.; Ripatti, S.; Huttunen, J.; Albanes, D.; Taylor, P.; Heinonen, G. 1997. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementes on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 349: 1715-1720.
82. Ravi, K.; Rajasekaran, S. y Subramanian, S. 2005. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology* 43: 1433-1439.
83. Rea, J. 1994. Andean roots. In J. E. Hernándo Beremejo and J. León (Eds), *Neglected crops: 1492 from a different perspective* (pp 165-179). Rome Italy: Plant Production and protection series N° 26, FAO.
84. Ríos de Molina, MC. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Quím Viva*: 2(1): 73-80.
85. Rubilar, M.; Pinelo, M.; Ihl, M.; Scheuermann, E.; Sineiro, J. y Nuñez, MJ. 2006. "Murta leaves (*Ugni Molinae Turcz*) as a source of antioxidant phenols". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 59-64.
86. Rubio, J.; Haixia, D.; Mengjuan, G.; Xinmin, L.; Shi-lin, Chen. y Gonzáles, G. 2007. Aqueous and hydroalcoholic extracts of blacks maca

- (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine- induced memory impairment in mice. Food and Chemical Toxicology 45: 1882-1890.
87. Ruch, RJ.; Cheng, SJ.; Klauning, J.E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracelular communication by antioxidant catchins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis 10: 1003-1008.
  88. Sandoval, M.; Okuhama, NN.; Angeles, FM.; Melchor, VV.; Condezo, LA. y Lao, J. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry 79: 207-213.
  89. Schemedes, A. y Holmer G. 1987. A new TBA method for determining free MDA and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. JAOCS 66:813-817.
  90. Schmermund, A.; Achenbach, S. y Budde, T. 2006. Effect of Intensive Versus Standard Lipid-Lowering Treatment With Atorvastatin on the Progression of Calcified Coronary Atherosclerosis Over 12 Months A Multicenter, Randomized, Double-Blind Trial. Circulation 113: 38-43.
  91. Schwartz, GG.; Olsson, AG.; Ezekowitz, MD.; Ganz, P.; Oliver, MF.; Waters, D. y Col. 2001. Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. JAMA 285: 1711-1718.
  92. Silagy, CA. y Neil, HA. 1994. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. J Hypertens 12: 463 - 468.
  93. Singleton, VL., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, RM. 1999. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent". Meth in Enzymol 299,: 152-178.
  94. Stevinson, C.; Pittler, MH y Ernst, E. 2000. Ajo para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Ann Intern Med 133 (6):420-429.
  95. Stojakovic, T.; Putz Bankuti, C.; Trauner, M. y Col. 2007. Atorvastatin in Patients with Primary Biliary Cirrhosis and Incomplete Biochemical Response to Ursodeoxycholic Acid. Hepatology 46(3):776-784.
  96. Suárez, S. 1995. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios Tesis Magister en Bioquímica Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 53Pp.
  97. Tomás, J.; Moya, J.; Campuzano, R.; Barrios, V.; Megías, A.; Ruiz, S.; Paz Catalán, Recarte, M. y Muriel, A. 2004. Determinación no invasiva del efecto de atorvastatina en la microvasculatura coronaria y la función endotelial periférica de pacientes dislipémicos. Rev Esp Cardiol 57: 909 - 915

98. Topol, EJ. 2004. Intensive statin therapy—a sea change in cardiovascular prevention. *N Engl J Med* 350: 1562-1564.
99. Torres, C. 2003. Efecto de maca sobre el peso vivo, dosaje de hemoglobina y toxicidad a nivel hepático y renal en ratones. Tesis para optar el título de Bióloga Universidad Nacional La Agraria La Molina. 94 Pp.
100. Torres, R. 1984. Estudio nutricional de la maca (*Lepidium meyenii* Walp.) y su aplicación en la elaboración de una bebida base. Tesis Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional la Agraria la Molina Lima-Perú 95 pp.
101. Trinder. 1969. *Ann Clin. Biochem* 6: 637.
102. Valentová, K.; Buckiová, D.; Kren, V.; Peknicová, J.; Ulrichová, J. y Simánek, V. 2006. The in vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biol Toxicol.* 22(2): 91-99.
103. Valerio, LG.; y Gonzáles, G.F. 2005. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*): A critical synopsis. *Toxicological Review* 24: 11-35.
104. Van Oostrom, AJ.; Van Wijk, JP. y Castro, CM. 2004. Lipaemia, Inflammation and Atherosclerosis: Novel Opportunities in the Understanding and Treatment of Atherosclerosis. *Drugs* 64 (Supl. 2): 19-41
105. Wang, Y.; McNeil, B. y Harvey, L.M. 2007. Maca: Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research Int* 40: 783-792.
106. Wang, R.; Yan, H. y Tang, X. C. 2006. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta pharmacol Sin* 27: 1-26.
107. Willard, T. 2000. Sowing your wild oats and reaping love's benefits. *Total health* 22(4): 62-63.
108. Wolf, G. 2005. "The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill". *J Nutr* 135(3): 363-366.
109. Xia, X.; Ling, W.; Ma, J.; Xia, M.; Hou, M.; Wang, Q. y Col. 2006. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E deficient mice. *J Nutr* 136(8): 2220-2225.
110. Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T. y Terao, Y. 1998. "HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of food by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil". *Bioscience Biotechnol and Biochem* 62: 1201-1204.

111. Yllescas, M. 1994. Estudio Químico y Fisicoquímico de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp. "Maca" procedente de Carhuamayo (Junin). Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. 103 Pp.
112. Yu, LJ. y Jin, WW. 2004. Study on nutritional components and the antifatigue effect of dry powder of maca (*Lepidium meyenii*). Food Science 25(2): 164-166.
113. Zheng, BL.; He, K.; Kim, C.; H., Rogers, L.; Shao, Y. y Hung, ZY. 2000. Effect of lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. Urology 55(4): 598-602.
114. Zapata, L.; Gerard, L.; Davies, C. y Schvab 2007. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. Ciencia, Docencia y Tecnología 35: 173-193.
115. Zorrilla, G.; Izquierdo, M. y Izquierdo, E. 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: Carcinogénesis y terapia antioxidante. Rev Cubana Invest Bioméd 23(1): 51-57.

