



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



AT 2025-FFBB-003

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

Determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* "Tarwi"

Presentado por:

CARBAJAL SAIRITUPAC, GLENY LISBETH

Bachiller del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **13%** por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Con Código de Matricula: 20155123

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad. Observaciones:

Ica, 21 de enero de 2025

.....
Dr. PEÑA GALINDO JULIO JOSE
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”

Línea de investigación:

Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

Presentado por:

BACH. CARBAJAL SAIRITUPAC GLENY LISBETH

ICA, PERÚ

2024

DEDICATORIA

A mis padres Elsa Sairitupac Mantari y Damian Carbajal Escobar quienes con su esfuerzo día a día me dieron la oportunidad de cumplir uno de mis grandes sueños.

A mis hermanos Anderson y Marilyn, que han sido mi ejemplo y motivación para seguir adelante con mis metas.

A mis abuelos por sus enseñanzas y por el amor que me brindaron en vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi guía y estar conmigo siempre.

A mi asesor Dr. Jorge Antonio García Ceccarelli por su apoyo, orientación y dedicación durante el desarrollo del presente trabajo.

En general a todas las personas que han formado o forman parte de mi vida, les agradezco haberme brindado su apoyo.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	V
Índice de figuras.....	VI
Resumen.....	IX
Abstract.....	10
I. Introducción.....	11
II. Estrategia metodológica.....	27
2.1. Tipo. Nivel y diseño de la Investigación.....	27
2.2. Lugar de Investigación.....	27
2.3. Materiales de trabajo.....	27
2.4. Hipótesis y variables.....	30
2.5. Población y muestra.....	31
2.6. Métodos, técnicas y procedimientos para la recolección de datos.....	31
2.7. Técnicas de procesamiento de la información.....	37
2.8. Técnica de análisis e interpretación de la información.....	37
2.9. Aspectos éticos.....	37
III. Resultados.....	39
IV. Discusión.....	53
V. Conclusiones.....	56
VI. Recomendaciones.....	57
VII. Referencias bibliográficas.....	58
VIII. Anexos.....	61

Índice de tablas

- Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de caracterización el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.....39
- Tabla 2. Determinación de Metabolitos Secundarios en el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.....40
- Tabla 3. Valores de absorbancia de las diluciones patrones de trolox por el método FRAP.....41
- Tabla 4. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por el método FRAP.....44
- Tabla 5. Lectura de absorbancias de las diluciones de patrón de trolox por el método ABTS.....45
- Tabla 6. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por el método ABTS.....47
- Tabla 7. Lectura de absorbancias de las diluciones del patrón trolox por el método DPPH.....49
- Tabla 8. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por el método DPPH.....51

Índice de figuras

Figura 1. <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi” en estado natural.....	17
Figura 2. Flores y hojas de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”	18
Figura 3. Distribución del género <i>Lupinus</i> en el mundo.....	19
Figura 4. Mapa de la provincia de Huaytará donde se encuentra el distrito de Santiago de Chocorvos lugar de muestreo de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”	20
Figura 5. Mecanismo del antioxidante.....	22
Figura 6. Estructura del radical libre.....	24
Figura 7. Fuentes de formación de radicales libres.....	25
Figura 8. Factores del estrés oxidativo.....	26
Figura 9. Curva de calibración de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP.....	42
Figura 10. Correlación entre concentración del extracto etanólico de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi” y TEAC (mM)	44
Figura 11. Curva de cuantificación de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS.....	46
Figura 12. Correlación entre concentración del extracto etanólico de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi” y la capacidad antioxidante equivalente de trolox como milimoles.....	48
Figura 13. Correlación entre la concentración de trolox y el porcentaje de inhibición del radical DPPH	50
Figura 14. Correlación entre la concentración del extracto extracto etanólico de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi” y el porcentaje de inhibición.....	52
Figura 15. Limpieza de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”.....	61
Figura 16. Fraccionamiento de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”	61

Figura 17. Colocación de las fracciones de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”	62
Figura 18. Medición de solvente extractante para la maceración de las partes aéreas de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”	62
Figura 19. Adicionando alcohol a la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi” para maceración.....	63
Figura 20. Macerando la especie la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	63
Figura 21. Filtrando el macerado de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	64
Figura 22. Extracto etanólico seco de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	64
Figura 23. Fracción A de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	65
Figura 24. Fracción Insoluble de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	65
Figura 25. Fracción B de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	66
Figura 26. Fracción C de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	66
Figura 27. Fracción D de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	67
Figura 28. Fracción E de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	67
Figura 29. Detección de taninos de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	68
Figura 30. Detección de aminoácidos de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	68
Figura 31. Detección de flavonoides de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”	69
Figura 32. Detección de cardenólidos de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	69
Figura 33. Detección de catequinas de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	70
Figura 34. Detección de esteroides y triterpenoides de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	70
Figura 35. Detección de alcaloides (reacción de Mayer) de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	71
Figura 36. Detección de alcaloides (reacción de dragendorff) de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi ”	71
Figura 37. Detección de alcaloides (reacción de Hager y Wagner) de la especie <i>Lupinus Mutabilis</i>	

<i>Sweet “Tarwi”</i>	72
Figura 38. Detección de saponinas de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet “Tarwi”</i>	72
Figura 39. Determinación de sólidos totales de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet “Tarwi”</i>	73
Figura 40. Determinación de cenizas de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet “Tarwi”</i>	73
Figura 41. Constancia de la certificación botánica de la especie <i>Lupinus Mutabilis Sweet “Tarwi”</i>	74

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo primordial evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”. La muestra fue recolectada en el distrito de Santiago de Chocorvos, provincia de Huaytará, en el departamento de Huancavelica. Se obtuvo el extracto etanólico por maceración de las partes aéreas, utilizando etanol de 96° como solvente de extracción. Para determinar los metabolitos secundarios se realizó un tamizaje fitoquímico y la identificación se efectuó por reacciones de coloración y/o precipitación. Los métodos empleados para la determinación de la actividad antioxidante fueron: DPPH, FRAP y ABTS. Se determinó la presencia de compuestos bioactivos de naturaleza alcaloide, flavonoide, triterpenoide y/o esteroide, antraquinonas, catequinas, saponinas y aminoácidos libres; en cuanto a los resultados de la actividad antioxidante se encontró que en el método del radical DPPH se obtuvo un IC50 equivalente a 5,08 mg/mL de extracto; por el método FRAP se obtuvo 1 mM de trolox es equivalente a 0.750 mg/mL; en el método de radical libre ABTS se halló 1 mM de trolox es equivalente a 0.203 mg/mL de extracto. Concluyendo que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” presenta actividad antioxidante por los métodos estudiados.

Palabras clave *Lupinus Mutabilis Sweet*, actividad antioxidante, DPPH, FRAP, ABTS.

ABSTRACT

The main objective of the present work was to evaluate the antioxidant activity of the ethanolic extract of the aerial parts of *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”. The sample was collected in the district of Santiago de Chocorvos, province of Huaytará, in the department of Huancavelica. The ethanolic extract was obtained by maceration of the aerial parts, using 96° ethanol as extraction solvent. To determine the secondary metabolites, a phytochemical screening was carried out and the identification was made by staining and/or precipitation reactions. The methods used for the determination of antioxidant activity were: DPPH, FRAP and ABTS. The presence of bioactive compounds of alkaloid, flavonoid, triterpenoid and/or steroid nature, anthraquinones, catechins, saponins and free amino acids was determined; as for the results of the antioxidant activity it was found that in the DPPH radical method an IC₅₀ equivalent to 5.08 mg/mL of extract was obtained; by the FRAP method 1 mM of trolox was obtained is equivalent to 0. 750 mg/mL; in the ABTS free radical method 1 mM of trolox was found is equivalent to 0.203 mg/mL of extract. Concluding that the ethanolic extract of the aerial parts of *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” presents antioxidant activity by the studied methods.

Keywords: *Lupinus Mutabilis Sweet*, antioxidant activity, DPPH, FRAP, ABTS.

I. INTRODUCCION

En el mundo y especialmente en nuestro país existe una gran variedad de recursos vegetales, en todo el orbe estos recursos han sido extraídos y utilizados desde tiempos muy antiguos, la gran mayoría de estas plantas presentan propiedades medicinales, las mismas que en el pasado fueron utilizadas por los llamados o denominados curanderos, brujos, hechiceros o santeros como una eficaz medicina para el tratamiento de diferentes enfermedades que afectaban a la población. En la actualidad, se ha profundizado el estudio para la extracción de algunos principios activos de fuentes vegetales principalmente para la elaboración de medicamentos, por lo que es importante y fundamental continuar desarrollando este tipo de estudios con la finalidad de revalorizar a las plantas.

En los últimos años se vienen efectuando o realizando numerosas investigaciones utilizando los recursos vegetales teniendo como objetivo primordial o finalidad encontrar nuevos antioxidantes naturales que puedan ser utilizados en diferentes procesos, procedimientos o productos, los cuales posteriormente se busca que sean utilizados en la industria alimentaria, cosmética o en la producción de diferentes tipos de productos farmacéuticos; los mismos que deben tener como propósito fundamental o decisivo la mejora de la salud de la población, estos productos deben servir para prevenir, disminuir, sanar o curar procesos degenerativos de las personas; ya que estos se originan por la presencia de radicales libres en nuestro organismo (1).

Hoy en día, el uso de las plantas medicinales se ha convertido en una importante alternativa en algunas terapias y tiene una alta prevalencia, precisamente esa es una de las razones por la cual proponemos que se realice la presente investigación “Determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

1.1 Descripción de la realidad problemática.

La especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”, es una planta leguminosa oriunda de los andes peruanos, que en los últimos años se ha difundido una larga lista de propiedades nutricionales, así como también es una fuente potencial para la producción agrícola.

El consumo de tarwi constituye un patrón cultural; económicamente genera producción agraria y ganancias; existe desconocimiento de los pobladores sobre su composición y valor nutricional; por lo tanto, es importante promover la producción de este cultivo, crear valor agregado y promocionar este producto a través de su consumo y comercialización para mejorar las condiciones de vida de los productores (2).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo de investigación es evaluar la capacidad antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

1.2 Antecedentes de la Investigación

- Quispe Z. (3) en su investigación: “Efecto biocida del extracto hidroalcohólico de semillas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say “zancudo”. (2013), se determinó que el extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas son tóxicas, generan mortalidad larval en *Culex quinquefasciatus* “zancudo” de 70 a 75% a las diluciones de 9 000 a 11 000 mg/L, los menores valores de mortalidad (32,5 y 35%), también se demostró en el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” que los principales productos biotóxicos responsables de la mortalidad de las larvas son los alcaloides y las lactonas, reportados como los más abundantes (+++). En menor concentración fueron halladas los taninos, saponinas y aminos (+).
- Borja J. (4) en su investigación: “Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus Mutabilis Sweet* (Tarwi) mediante proteasas de *Bacillus* sp.” (2014), demostraron que los hidrolizados proteicos H90EA y H90CE presentaron mayor actividad antioxidante de

10,09 y 5,58 %, y un menor valor del CI50 de 41,38 y 59,80 µg / mL, respectivamente, mediante la reacción con DPPH.

- Huamán N. (5) en su investigación: “Biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*” (2015), la muestra recolectada es procedente de la comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región Ayacucho. Mediante el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”. Se calculó la concentración letal media (CL50) mediante el método de análisis Probit y el screening fitoquímico preliminar a fin de determinar la composición química de las sustancias hidroalcohólicas presentes en la planta. La concentración letal media (CL50) fue establecida en 17 470 ppm, reportándose a los fenoles y taninos pirogalotánicos (+++) como los más abundantes, seguido de los flavonoides y triterpenos en poca cantidad (++), finalmente los alcaloides como trazas (+). En conclusión, el efecto biotóxico de la planta probablemente esté relacionada con la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos, algunos tipos de fenoles y taninos, y a la complejidad de los productos trazas.
- García G. (6) en su trabajo: "Determinación del efecto del desamargado y fermentado en el contenido de compuestos con capacidad antioxidante de tres variedades de chocho (*Lupinus Mutabilis Sweet*)” (2018), Se determinó que la variedad con mayor contenido de ácido ascórbico, carotenoides totales y zinc fue INIAP450 Andino, mientras la variedad INIA-451 Guaranguito presentó el mayor contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.
- Rosas Y. (7) en su trabajo: “Eliminación de los alcaloides del *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) por fluidos supercríticos (CO₂) con co-solventes." (2019), mediante el uso dióxido de carbono en estado supercrítico y co-solventes, a un tamaño de partícula en el rango de 1,40 a 0,355 mm, se estudió el efecto del tipo de co-solvente y la condición de operación (presión/temperatura) en la remoción de alcaloides de la muestra en estudio,

aplicando un diseño experimental 2² con réplica en todos sus puntos, haciendo uso del método colorimétrico de púrpura bromocresol en espectrofotómetro UV a fin de determinar la concentración de alcaloides totales remanente tras el tratamiento. En conclusión, se obtuvo una concentración de alcaloides totales remanente de 0,02% en una fracción de la muestra tratada, lo que asegura su consumo de acuerdo a los límites establecidos por la 94 FAO y la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2390:2004

- Córdova-Ramos et al. (8) en su investigación: "Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuesto fenólicos totales del lupino (*Lupinus Mutabilis* Sweet) andino." (2020) se evaluaron por espectrofotometría el contenido de fenólicos totales (TPC; método Folin-Ciocalteu) y la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS+). Los resultados mostraron que los procesos tecnológicos disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) antioxidantes y compuestos fenólicos.
- Arellano A. (9) en su investigación: "Análisis nutricional y actividades biológicas de compuestos bioactivos derivados del chocho (*Lupinus Mutabilis*).” (2022), se realizaron revisiones bibliográficas a partir de: artículos científicos, tesis, libros y otras publicaciones donde se abordó el valor nutricional, componentes bioactivos y actividades biológicas en diferentes especies de lupinus. El *Lupinus mutabilis* mostró altos contenidos de proteína, aminoácidos esenciales y vitaminas en comparación con otras especies de lupinus, además presentó un perfil nutricional mayor a la soja en cuanto a proteína y grasa, convirtiéndolo en una materia prima valiosa en la producción de aceites y suplementos proteicos. Llegando a la conclusión que los compuestos bioactivos (polifenoles, fitoesteroles, tocoferoles, carotenoides, alcaloides) presentes en el *lupinus mutabilis* son responsables de diferentes actividades biológicas como la antioxidante, antidiabética, anticancerígena y antimicrobiana; por tanto, su consumo podría ayudar a prevenir enfermedades crónicas no transmisibles entre ellas la diabetes, algunos tipos de cáncer, etc.

1.3 Justificación e Importancia.

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de productos antioxidantes ya que estos podrían ofrecer grandes beneficios a los seres humanos; se vienen efectuando o realizando una gran variedad de estudios en este campo los mismos que afirman que los alimentos que poseen propiedades antioxidantes ayudan a controlar los radicales libres y por lo tanto combaten el estrés oxidativo de las células (10).

En el Distrito de Santiago de Chocorvos, Provincia Huaytará, Región Huancavelica, se utiliza *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”, tanto las partes aéreas como el fruto en base a los conocimientos tradicionales transmitidos a través de las generaciones, sin embargo, la gran mayoría de estudios se basa en el fruto como alimento.

Al existir escaso conocimiento sobre las propiedades terapéuticas de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” se decidió investigar la actividad antioxidante, tomando como base conocimientos de estudios preliminares de actividades realizadas, las mismas que servirán para fortalecer las bases científicas para este y otros futuros estudios.

El presente trabajo busca recopilar información que ayude a respaldar el uso de esta especie vegetal en la medicina tradicional.

1.3 Objetivos de la Investigación.

a) Objetivo General:

- Evaluar la capacidad antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

b) Objetivos Específicos:

- Determinar los posibles grupos de componentes químicos responsables de la actividad antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por los métodos de ABTS, DPPH

y FRAP.

- Identificar el método antioxidante que presenta mayor actividad en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”

Descripción de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”:

Planta de tallo erecto, mide entre 0,5 a 2m de altura; sus hojas están formadas por número impar de foliolos, su aspecto es semejante a un paraguas cerrado. En especies silvestres y las cultivadas con fines ornamentales, las flores se reúnen en largas y vistosas inflorescencias; las especies cultivadas para la alimentación tienen inflorescencias más pequeñas y poco notorias. Los colores de sus pétalos varían desde el blanco hasta el azul intenso, su fruto es una legumbre que contiene semillas con forma de esfera achatada (11).

Se diferencia de otras especies de *Lupinus* en que las hojas tienen menos vellosidades, en cuanto a las semillas de tarwi estas se encuentran en una vaina de 5 a 12 cm y varían de forma, las semillas son recubiertas por un tegumento endurecido el cual puede constituir en algunos casos hasta 10 % de su peso total; en ella se encuentran los alcaloides que le dan el sabor amargo. Cada flor mide alrededor de 1,2 cm, presenta corola con cinco pétalos, la coloración de la flor varía desde el inicio de su formación hasta la maduración, partiendo de un azul claro hasta un azul muy intenso (11).



Figura 1. *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi” en estado natural

Taxonomía de *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”:

La muestra fue identificada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (N°050-USM-NHN-2022) según el sistema de clasificación de APG IV (2016). *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”. Se tiene la siguiente posición taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: Lupinus

Especie: *Lupinus mutabilis* sweet

Nombre común: Tarwi



Figura 2. Flores y hojas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”

Distribución de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”:

Amparo Iris Zavaleta, 2018; en su libro *Lupinus Mutabilis Sweet* (Tarwi) leguminosa andina con gran potencial industrial; indica que el tarwi se siembra principalmente en la zona andina de Ecuador, Perú y Bolivia, recibe diferentes denominaciones y es usado en la alimentación humana. Es cultivado en Perú, en las zonas de sierra desde Cajamarca hasta Puno. Miembro perteneciente a la familia Fabaceae, especie vegetal que ha sido cultivada en las zonas andinas desde épocas preincaicas alcanzando su máximo esplendor, mejoramiento y producción en la época incaica; lamentablemente en la actualidad su cultivo y consumo ha disminuido considerablemente por lo que es de suma importancia revalorizar esta especie (11).

El origen del lupino se atribuye a dos grandes grupos; los del viejo mundo (Mediterráneo), denominados altramuces o *Lupinus dulces* y los del Nuevo Mundo denominados tarwis o chochos y sus parientes silvestres, en este contexto se seleccionan los lupinos andinos para el consumo humano. El consumo va desde Colombia hasta Bolivia (11,12).



Figura 3. Distribución del género *Lupinus* en el mundo.

Fuente: Tapia M. 2015 (12).



Figura 4. Mapa de la provincia de Huaytará, donde se encuentra el distrito de Santiago de Chocorvos, lugar de muestreo de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”

Usos tradicionales de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”:

Debido a la información transmitida a través de generaciones y costumbres; en estos momentos se conocen algunos usos de esta especie vegetal los mismos que son aplicados por la medicina tradicional; así podemos mencionar que contribuye a la reducción de dolores musculo articulares haciendo uso o mediante la aplicación de emplastos. Así como también ayudan en la prevención del estreñimiento, minimizan de manera visible los valores de grasas en sangre y la presión arterial, contribuyen a reducir los riesgos de padecer cáncer, problemas articulares y óseos, y enfermedades cardíacas (10).

1.5.2 Antioxidante

Es una sustancia capaz de retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato, considerando como sustrato a proteínas, lípidos, hidratos de carbono e incluso el ADN. Los antioxidantes también bloquean o inactivan los radicales libres, eliminando y previniendo el daño causado por la oxidación acumulada (13).

Mecanismo de acción de los antioxidantes (14)

Los antioxidantes previenen o retrasan la oxidación de sustratos biológicos y en algunos casos, el daño oxidativo a las moléculas afectadas puede revertirse. Según el mecanismo de acción se puede dividir en:

- Antioxidante preventivo: al inicio de la cadena de oxidación (agente redox peróxidos orgánicos e inorgánicos) como enzimas, catalasa, glutatión peroxidasa y peroxidasa.

- Antioxidante secundario: bloquea la cadena oxidativa en un determinado estadio, una vez comience, captura los radicales libres. Por ejemplo: vitaminas C y E, superóxido dismutasa.

Principales mecanismos de defensa antioxidante (15)

En el organismo se pueden distinguir 2 mecanismos de acción antioxidantes:

- El primero es enzimático y depende de la presencia de un grupo de proteína cuya actividad impide la formación y/o facilita la eliminación de radicales libres de especie pro oxidantes. Este mecanismo a su vez incluye algunas enzimas antioxidantes que realizan la "reparación" del sustrato biológicos que ya se han oxidado.

- El segundo mecanismo de defensa antioxidante es no enzimático, consiste en un grupo de moléculas que básicamente funcionan a través de su interacción directa con los radicales libres y sustancias prooxidantes. Dicha interacción evita e impide el inicio y/o propagación de procesos oxidativos.

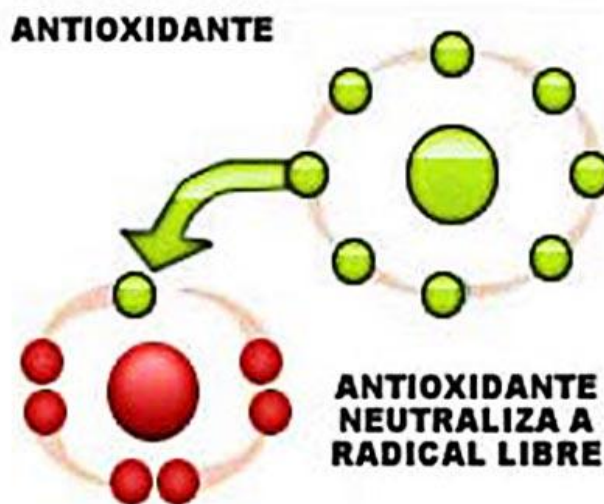


Figura 5. Mecanismo del antioxidante.

Fuente: <https://altitudchulec.blogspot.com/2011/09/radicales-libres-antioxidantes-y-altura.html>

Beneficios de los antioxidantes

Los antioxidantes brindan muchos beneficios para la salud en la prevención de enfermedades del corazón, los pulmones, cáncer, envejecimiento, cataratas, las autoinmunes, el mal del Párkinson, de la piel, cerebro y enfermedades oculares. En el caso del cáncer se cree que pueden prevenir la aparición de esta enfermedad o mal. Algunas posibilidades serían: Ayudan a detener las mutaciones provocadas por el ataque de los radicales libres. El agregar β caroteno ayuda a bloquear e impedir los cambios dañinos causados por los radicales libres, evitando que ataquen el material genético en la célula (16).

1.5.3 Radicales Libres

Los radicales libres son especies moleculares altamente reactivas con un electrón no apareado; duran poco tiempo antes de colisionar con otra molécula y sustraer o donar un electrón para lograr la estabilidad. En el proceso, generan o forman un nuevo radical a partir

de la molécula con la cual colisionaron. El modo principal en que se desactiva un radical libre, y así poner fin a esta reacción en cadena, es cuando dos radicales libres reaccionan juntos, cuando los electrones no apareados pueden formar par en una u otra de las moléculas originales. Dicho evento es raro, debido a la vida media muy breve de un radical individual y las concentraciones mínimas de radicales en los tejidos. Los radicales más dañinos en sistemas biológicos son los radicales de oxígeno (a veces denominados especies de oxígeno reactivas), especialmente superóxido, hidroxilo, y perhidroxilo. El daño de tejido causado por radicales de oxígeno se conoce como daño oxidativo (17).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son compuestos derivados de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial. Este grupo incluye a los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), producidos cuando el O_2 se reduce con 2 electrones, y las formas reactivas del oxígeno, que abarcan a los superóxidos y al radical hidroxilo ($OH^\cdot$) (18).

Las ERO tienen un rol indiscutible en los procesos fisiológicos normales, pero también pueden tener efectos tóxicos. Las ERO son el resultado del metabolismo y son esenciales para la generación de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, un proceso clave para el sistema inmunológico. Éstas también desempeñan un papel importante en la transducción de señales, que es importante para la comunicación y el funcionamiento celular. Por otro lado, en los últimos 20 años cada vez hay más evidencia que demuestra que las ERO pueden ser la causa de diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer, enfermedades coronarias y el envejecimiento. La reacción del radical hidroxilo con los lípidos insaturados es la cascada de daño más conocida inducido por radicales (ADN) (18).

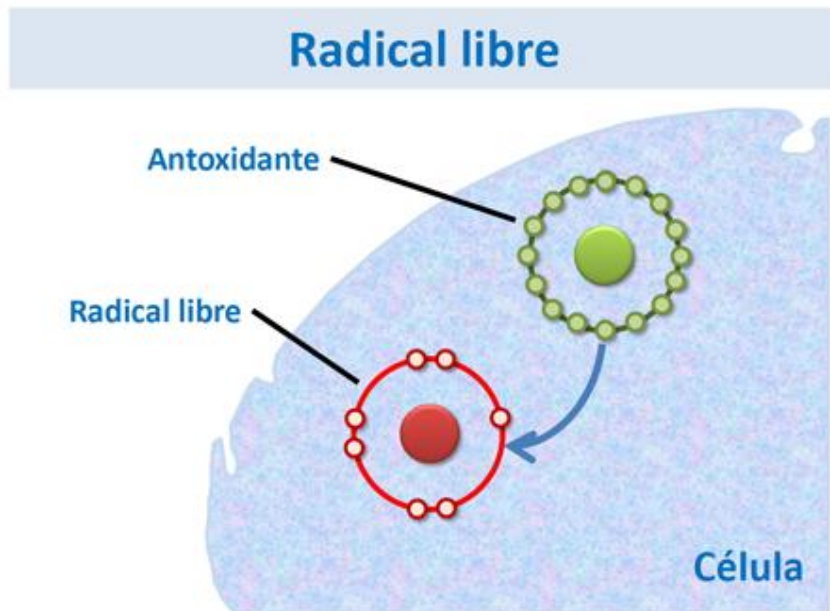


Figura 6. Estructura del radical libre

Efectos de los radicales libres:

Los radicales libres son moléculas reactivas producidas en nuestro organismo. Son la causa de la mayoría de los trastornos patológicos y del envejecimiento. Si se producen cantidades de radicales libres superiores a las fisiológicas, nuestros sistemas antioxidantes son incapaces de neutralizar este exceso, por lo que estos radicales libres atacan a las células provocando daños más o menos graves (19). Es entonces cuando nos encontramos frente al estrés oxidativo.

Los daños que provocan los radicales libres no son visibles inmediatamente, sino que aparecen con el tiempo, ya que son daños a nivel celular. Comienza a nivel de membrana, alterando los intercambios intra y extracelular; a nivel intracelular, se altera la producción de energía e incluso puede dar lugar a mutaciones en el ADN (19).

En conclusión, los radicales libres son un factor de riesgo importante por lo que es necesario su control y medición (19).



Figura 7. Fuentes de formación de radicales libres

Fuente: <https://ketomarket.es/blog/tips/antioxidantes-y-radicales-libres-rivales/>

1.5.5 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes. En el estrés oxidativo se produce un desequilibrio que favorece un aumento significativo de la concentración de especies oxidantes reactivas (20).

Los efectos beneficiosos de ERO fueron manifestados a baja concentración, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula, como la defensa contra agentes infecciosos y los sistemas de señalización celular (21).

Es importante destacar el equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de los radicales libres, es un aspecto muy importante para los organismos vivos, a través del mecanismo de “regulación redox” que protege a los organismos vivos del estrés oxidativo, manteniendo el control del estado de oxidación a través de los sistemas antioxidante y captadores de radicales libres (21).

El daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como la duración del estrés, la eficacia de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y los factores genéticos que codifican el sistema antioxidante (22).

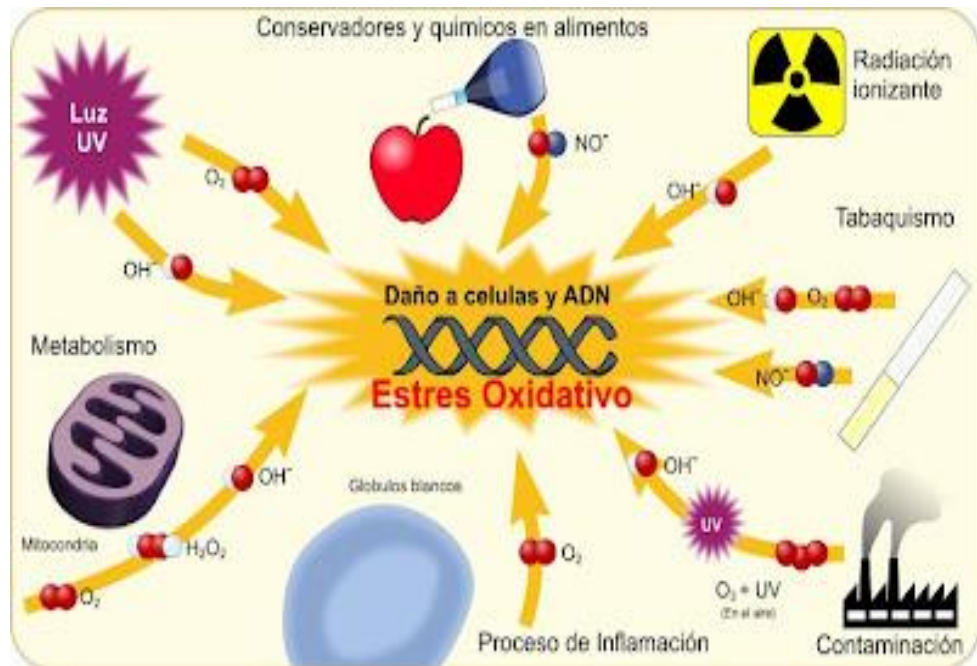


Figura 8. Factores del estrés oxidativo

II. ESTRATEGIA METODOLOGICA

2.1 Tipo, Nivel y Diseño de la Investigación

2.1.1 Tipo de Investigación:

Básica

2.1.2 Nivel de Investigación:

Descriptivo - Explicativo

2.1.3 Diseño de Investigación:

Analítico

2.2 Lugar de Investigación:

Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Facultad de Farmacia y Bioquímica, departamento de Ciencias Químicas.

2.3 Materiales de Trabajo

2.3.1 Materiales de Laboratorio:

- Probetas 10 ml, 50 ml y 100 ml
- Matraces Erlenmeyer
- Balones
- Fiolas
- Agitadores de vidrio
- Vasos de precipitado
- Tubos de ensayo
- Gradillas

- Espátulas de metal
- Vasos de vidrio
- Embudos
- Luna de reloj
- Cápsula de porcelana
- Crisoles
- Pinzas metálicas
- Micropipetas de 100uL
- Micropipetas de 1000uL
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml
- Propipetas
- Baguetas
- Peras de Bromo
- Soporte Universal
- Aro de Soporte

2.3.2 Equipos de Laboratorio:

- Balanza Analítica
- Potenciómetro
- Refractómetro
- Mufla
- Evaporador rotatorio

- Espectrofotómetro UV-Visible
- Estufa
- Ultrasonido

2.3.3 Reactivos

- Agua destilada
- Etanol 96°
- Alcohol 70°
- Tricloruro férrico
- Diclorometano
- Ácido Clorhídrico
- Acetato de sodio
- Hidróxido de Amonio 25%
- Ácido acético glacial
- Ácido nítrico
- 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)
- 2,4,6- tripiridyl-s-triazida (TPTZ)
- Trolox Hoffmann
- ABTS
- Persulfato de sodio

2.3.4 Otros

- Guantes
- Mascarilla
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Papel tissu
- Papel toalla
- Viales

2.4 Hipótesis y Variables.

2.4.1 Hipótesis

a. General:

- El extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” presenta una apreciable capacidad antioxidante.

b. Específicas:

- Los grupos de componentes químicos responsables del efecto antioxidante del extracto etanólico *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” serían los flavonoides.
- El extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” presenta actividad antioxidante por los tres métodos analizados.
- El método ABTS presentará mayor actividad antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

2.4.2 Variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
VARIABLE INDEPENDIENTE		
Extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Lupinus Mutabilis Sweet</i> “Tarwi”.	Metabolitos secundarios	Reacciones de coloración y precipitación.
	Parámetros Fisicoquímicos	Sólidos totales, sólidos solubles, pH, cenizas.
VARIABLE DEPENDIENTE		
Actividad antioxidante	Método DPPH	IC ₅₀
	Método FRAP	TEAC
	Método ABTS	TEAC

2.5 Población y Muestra

2.5.1 Población:

Especies de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” presentes en el Departamento de Huancavelica, provincia de Huaytará, distrito de Santiago de Chocorvos.

2.5.2 Muestra:

Partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”

2.6 Métodos, técnicas y procedimientos para la recolección de datos

2.6.1 Recolección y clasificación de la muestra vegetal

La especie vegetal *Lupinus Mutabilis Sweet* fue recolectada por la autora en el Distrito de Santiago de Chocorvos, Provincia de Huaytará, Departamento de Huancavelica ubicada de 2 500 a 2 700 m.s.n.m. La recolección se realizó en las primeras horas de la mañana, utilizando una tijera de podar y bolsas de papel Kraft para posteriormente ser transportada a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.

La muestra fue clasificada taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos según el sistema de Clasificación de APG IV (2016).

2.6.2 Tratamiento de la muestra vegetal

- Selección: Después de la recolección, se procede a seleccionar la muestra vegetal que se encuentra en buen estado y se coloca en bolsas de papel Kraft para prevenir el proceso de descomposición.
- Limpieza: Se continua con la limpieza para descartar los residuos de tierra, eliminar suciedad, grasa u otras materias; con el fin de que estos no provoquen interferencias o alteraciones posteriores.
- Secado: Se realiza bajo sombra, para que no haya alteración en su composición, se distribuye la planta sobre hojas de papel Kraft durante 15 días; dando movimiento periódico. Una vez transcurrido el tiempo, se procede a cortar y triturar las partes aéreas

de la planta.

- Conservación: Se almacena la muestra en bolsas confeccionadas de papel Kraft hasta su posterior estudio.

2.6.3 Obtención del extracto etanólico

Aproximadamente 880 g de la planta seca y molida se empleó para efectuar la maceración con etanol 96° durante 15 días, durante este tiempo se realizó una agitación inter diaria.

Luego se llevó a cabo el filtrado del macerado, la concentración se realizó en un evaporador rotatorio o rotavapor y finalmente secada en una estufa a temperatura menor a los 40 °C.

2.6.4 Screening fitoquímico (23)

El tamizaje o screening fitoquímico, es una de las fases iniciales en la investigación de las variedades de especies vegetales ya que nos ayuda a efectuar una determinación cualitativa de los principales metabolitos secundarios o grupos químicos que se encuentran en la estructura de la especie vegetal, a partir de esto se puede orientar el fraccionamiento del extracto para efectuar posteriormente el aislamiento de los componentes de mayor interés. El efectuar el screening fitoquímico nos permite obtener o adquirir los diversos compuestos de la planta utilizando solventes apropiados y la posterior aplicación de reacciones de coloración y precipitación; lo cual permite la estimación rápida, con reacciones sensibles y reproducibles.

Obtención de Fracciones

Se tomaron 880 g de las partes aéreas secas y pulverizadas de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”, luego se procederá a macerar con alcohol de 96° durante 15 días, con agitación periódica con el objetivo de optimizar la extracción de los metabolitos primarios y secundarios, se filtra y posterior a ello se utilizó un evaporador rotatorio o rotavapor en donde se procedió a obtener un extracto seco. Se separó una porción y esto constituye la **Fracción A.**

Luego se extraerá con HCl al 1% (2 x 20 mL), se filtrará, obteniendo 2 fracciones:

- a) Insoluble:** Lavar hasta pH neutro usar H₂O destilada, disolver con 5mL de

CH₂Cl₂, luego secar con Na₂SO₄ anhidro, luego filtrar y posterior a ello esto se convertirá en la **Fracción B**.

b) Solución ácida: Se filtrará y alcalinizará con amoníaco, extraer con CH₂Cl₂ (2x25mL); se tendrá como resultado dos fases:

- ✓ **Fase Diclorometánica:** Lavar con 10 mL de H₂O, luego la fase CH₂Cl₂ secarla con Na₂SO₄ anhidro, filtrar para obtener la **Fracción C**.
- ✓ **Fase Acuosa:** Saturar con 5g de Na₂SO₄ anhidro; extraer con CH₂Cl₂ : etanol (3:2) (2x25mL), produciéndose 2 fases:
 - **Fase Orgánica:** Lavar con una solución Na₂SO₄ anhidro (10 mL) mezclándose las fases o partes acuosas. Luego deshidratar la fase orgánica con 1g de Na₂SO₄ anhidro. Filtrar para proceder a obtener la **Fracción D**.
 - **Fase Acuosa:** Añadir todos los residuos acuosos que resultaron del lavado de fase orgánica esto formará la **Fracción E**. Sobre estas fracciones se determinarán diferentes metabolitos.

Seleccionadas las diversas fracciones se realizará las distintas reacciones de coloración o precipitación para identificar los grupos de metabolitos y grupos funcionales presentes en el extracto etanólico de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

Reacciones sobre las fracciones:

Detección de Taninos:

1. **Reacción de gelatina-Sal.-** En 3 tubos de ensayo se agregan 0.5 mL de extracto; al primer tubo adicionar 1 mL de NaCl al 5%; al segundo tubo añadir gelatina al 1% y al tercer tubo agregar gelatina – sal; la precipitación con este último tubo o con el primer tubo y segundo tubo nos revela la presencia de taninos, si esto ocurre solamente con el primer tubo podría ser un falso positivo.
2. **Reacción de Cloruro Férrico.** - Depositar en un tubo de ensayo 0.5 mL de la

fracción A; agregar una gota de solución acuosa de FeCl_3 al 1%; la reacción es positiva al aparecer colores azul-negro, verde o azul verdoso.

Detección de Flavonoides

1. **Reacción de Shinoda.**- En 1 tubo de ensayo añadir 1 mL de extracto, agregar limaduras de Mg y 3 gotas de HCl concentrado. Verificar cambio de color; si se observa tonos de color rojo, anaranjado y violeta la reacción se considera positiva.

Detección de Aminoácidos

1. **Reacción de Ninhidrina.** - Emplear tiras de papel de filtro; con la ayuda de una pipeta capilar proceder de la siguiente manera:

- En una tira colocar gotas de extracto + 1 gota de reactivo Ninhidrina al 2%.
- Blanco: Solución etanólica de Ninhidrina al 2%.

Secar a temperatura ambiente, seguidamente las tiras de papel se colocan en una plancha calefactora hasta aparición de color en el blanco.

Si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo es indicación que la reacción resultó positiva.

Detección de Alcaloides

Tomar 3 tubos de ensayo y en cada tubo agregar 4 mL de extracto + 1 mL de HCl 1%; luego proceder a realizar la reacción de precipitación:

- ✓ **Dragendorff:** Agregar 2 - 4 gotas; ver la formación de precipitado anaranjado.
- ✓ **Mayer:** Adicionar 2 - 4 gotas; observar formación de precipitado blanco.
- ✓ **Hager:** Añadir 2 - 4 gotas; verificar la formación de precipitado amarillo.

Detección de Saponinas

1. **Prueba de Espuma.** – Colocar 2.5 mL del extracto en 2 tubos de ensayo y

agitar por unos minutos, dejar reposar 15 minutos, observar formación de espuma, si la altura de la espuma es menor de 5 mm se considera que la reacción es negativa.

2.6.5 Características Fisicoquímicas del extracto

Sólidos totales. - AOAC 925.03B

En una placa Petri se pesó un aproximado de 2 a 3 g de extracto seco, previamente es secada la placa Petri a 130°C por una hora, luego se coloca en un desecador hasta que alcance temperatura ambiente, seguidamente pesamos.

Colocamos en la estufa la placa destapada hasta secar a $130 \pm 3^\circ\text{C}$ por un tiempo de 1 hora (desde cuando la estufa alcanza la temperatura de los 130°C), tapamos la placa dentro de la estufa, culminado el tiempo transferimos al desecador, pesamos cuando alcance la temperatura ambiente. Efectuamos los cálculos y reportamos la pérdida de peso como humedad.

Sólidos solubles: AOAC 932.12.

Determinar a través del método refractométrico, se prepara una suspensión al 10% y después de calibrar el equipo se realiza la medición inmediatamente.

Cenizas: AOAC 923.03

Dentro de un crisol pesar 1 a 3 g de muestra o extracto seco, este debe ser preliminarmente incinerado o calcinado a la temperatura de 550°C, luego enfriarlo en un desecador.

Ubicar el crisol con la muestra en la mufla a 550°C e iniciar el proceso hasta obtener cenizas blanca o ligeramente grises o hasta obtener un peso constante. Enfriar en el desecador, pesar cuando alcance temperatura ambiente; posterior a ello calcular el residuo como cenizas totales.

pH: AOAC 981.12

Se determinará por el método electrométrico, en el cual se prepara una suspensión al 10%

y luego de calibrar el equipo se realiza la medición directamente.

2.6.6 Determinación de la actividad antioxidante

2.6.6.1. Determinación de actividad antioxidante por método DPPH:

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Williams et al., DPPH (2, 2 – difenil-1-picrilhidracilo) este método se emplea para evaluar la actividad antioxidante tanto en alimentos como extractos vegetales, basado en la reducción del radical estable DPPH, se manifiesta como un cambio en la coloración azul-violeta, hacia amarillo pálido frente a un compuesto con capacidad antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 515 nm.

Para el protocolo desarrollado se utilizaron 3.1 mg del radical DPPH y se diluyeron en 100 ml de metanol analítico al 80% determinando que la absorbancia se encuentre entre 0.9 - 1.0 a la longitud de onda antes mencionada. (24)

2.6.6.2. Determinación de actividad antioxidante por método FRAP:

Se empleó la metodología recomendada por Benzie y Strain (1996), método empleado para evaluar la actividad o capacidad antioxidante de diferentes muestras, este método se fundamenta en reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con el TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), hasta obtener la forma de hierro ferroso (Fe^{+2}); mediante la donación o cesión de electrones del antioxidante; preparar el reactivo FRAP que está compuesto de solución buffer acetato 300mM, el TPTZ 10 mM en HCl 40mM y sulfato férrico 20 mM en proporción 10:1.1, se toma 3mL de este reactivo y se adiciona 100ul del extracto o patrón a utilizar se deja reaccionar en oscuridad por 6 minutos y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Los resultados se expresarán como valores TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones del estándar Trolox. (25)

2.6.6.3. Determinación de actividad antioxidante por método ABTS:

Método de ensayo utilizado por Arnao et al. (2001), su principio o fundamento está en la cuantificación mediante la decoloración del radical ABTS⁺, debe existir una reacción o interacción con especies donadoras de hidrógeno o electrones. El radical ABTS⁺ es un cromóforo que absorbe o trabaja a una longitud de onda de 734 nm; los resultados se expresarán como valores trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), para lo cual se efectuará la construcción de una curva patrón utilizando como solución estándar el Trolox. (26)

2.7 Técnicas de procesamiento de la información

➤ Recolección de datos analíticos

Se llevó a cabo en los cuadernos de trabajos donde se registraron los resultados obtenidos de las aplicaciones de las técnicas analíticas utilizadas en cada uno de los casos.

➤ Procesamiento de datos

Los datos se procesaron en el Programa Microsoft Excel 2013 y se expresan como promedios a partir de los cuales se elaboraron los gráficos correspondientes.

2.8 Técnicas de Análisis e interpretación de la información

Los datos obtenidos durante los procesos de análisis de la determinación de la actividad antioxidante serán sometidos a técnicas de análisis paramétricas, tales como la determinación del promedio y técnicas no paramétricas como el coeficiente de correlación para poder encontrar el IC₅₀ o TEAC según el método aplicado.

2.9 Aspectos éticos

En la presente investigación se ha vigilado los aspectos éticos relevantes de todo trabajo universitario como herramienta del conocimiento científico para el progreso de la sociedad, frenando la manipulación de todos los factores que pudieran servir a intereses particulares y distorsionar los objetivos de la investigación. Motivo por el cual se ha

citado, lo más oportunamente posible todos los artículos en los cuales nos hemos basados, protegiendo los derechos de autor correspondientes, consciente de ellos asumimos las responsabilidades resultantes.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de caracterización el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

Parámetros	Resultados	Unidades
Sólidos totales	84,68	g/100g
Sólidos solubles	3,70	° Brix
pH	3,70	..
Cenizas	0,85	g/100g
Color	Negro verdoso	--
Aspecto	Pasta densa y viscosa	--
Olor	Suigéneris	--

Tabla 2. Determinación de Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”.

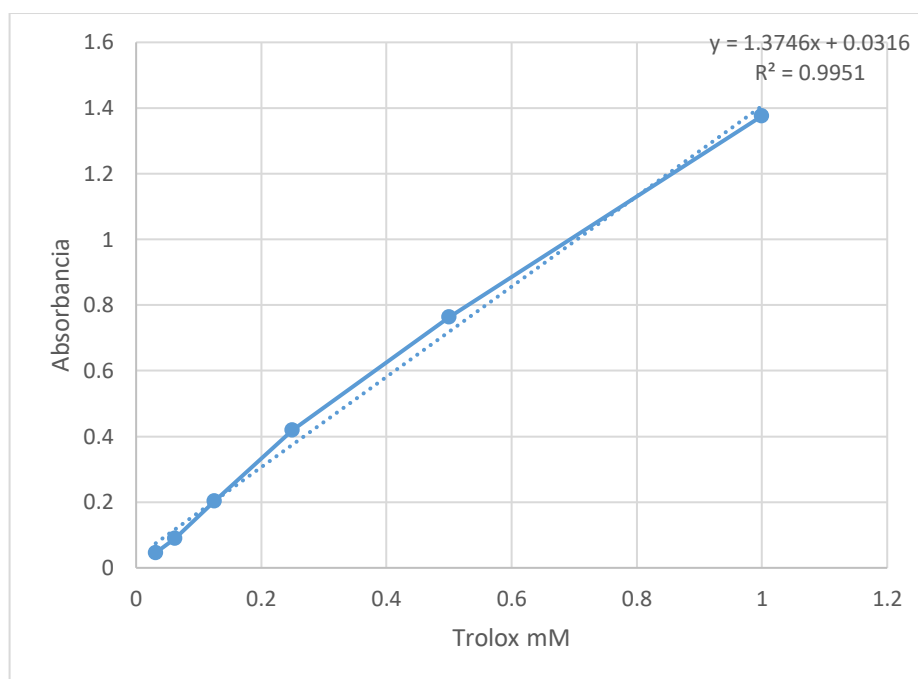
Fracciones obtenidas	Metabolito secundario	Reacción de Identificación	Resultados
A	Taninos	Gelatina- sal	Negativo (-)
		Cloruro férrico	Positivo (+)
	Grupos aminos libres	Ninhidrina	Positivo (+)
	Flavonoides	Shinoda	Positivo (+)
B	Triterpenoides y/ o esteroides	Liebermann- Burchard	Positivo (+)
	Antraquinonas	Borntrager	Positivo (+)
C	Triterpenoides y/ o esteroides	Liebermann- Burchard	Positivo (+)
	Alcaloides	Dragendorff	Positivo (+)
		Mayer	Positivo (+)
		Wagner	Positivo (+)
	Cardenólidos	Kedde	Negativo (-)
D	Flavonoides	Shinoda	Positivo (+)
	Leucoantocianidinas y catequinas	Rosenheim	Positivo (+)
	Cardenólidos	Kedde	Negativo (-)
	Triterpenoides y/ o esteroides	Liebermann- Burchard	Positivo (+)
	Alcaloides	Dragendorff	Positivo (+)
		Mayer	Positivo (+)
		Wagner	Positivo (+)
E	Flavonoides	Shinoda	Positivo (+)
	Leucoantocianidinas y catequinas	Rosenheim	Positivo (+)
F	Saponinas	Prueba de espuma	Positivo (+)

Nota: Para considerar positivos taninos deben dar positivas las dos reacciones.

Tabla 3. Valores de absorbancia de las diluciones patrones de trolox por el método FRAP

Trolox mM	Abs1	Abs2	Promedio
0.0312	0.046	0.045	0.046
0.0625	0.085	0.093	0.089
0.125	0.208	0.198	0.203
0.25	0.427	0.412	0.419
0.5	0.756	0.77	0.763
1	1.395	1.357	1.376

Figura 9. Curva de calibración de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP



Empleando la ecuación de la curva $Y = 1.3746x + 0,0316$; se obtendrán equivalentes de Trolox de cada dilución del extracto.

Tabla 4. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por el método FRAP.

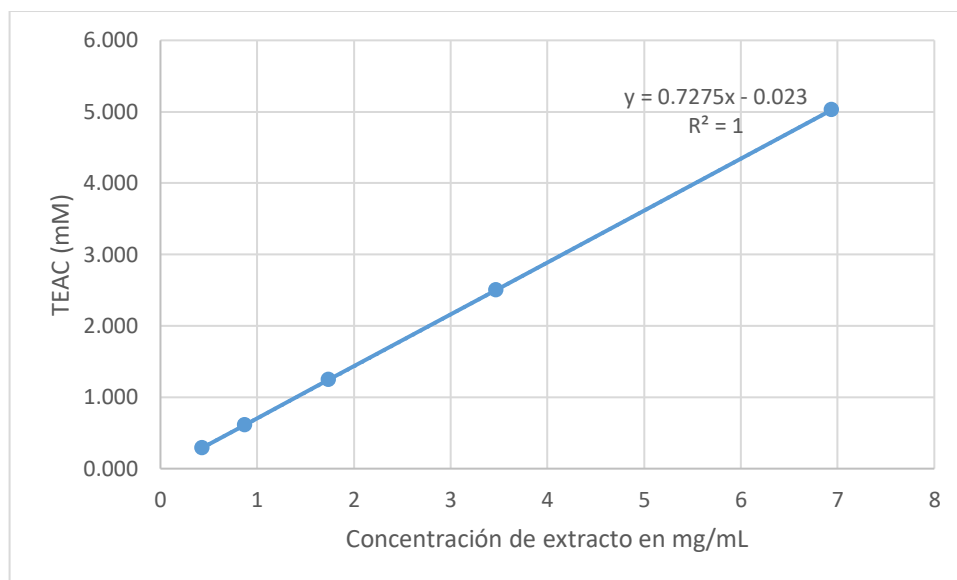
Extracto				
mg/mL	Abs1	Abs2	Prom Abs	TEAC
0.43	0.078	0.084	0.081	0.036
0.87	0.192	0.203	0.198	0.121
1.74	0.496	0.472	0.484	0.329
3.47	0.976	0.988	0.982	0.691
6.94	1.758	1.784	1.771	1.265

Nota: Abs = absorbancia

Prom = promedio

TEAC = Capacidad antioxidante equivalente al trolox

Figura 10. Correlación entre concentración del extracto etanólico de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi” y TEAC (mM)



Mediante la aplicación de la ecuación de la curva $Y = 0.7275x - 0.023$ se obtiene:

1mM de trolox equivale a 0,750 mg/mL de extracto

Tabla 5. Lectura de absorbancia de las disoluciones de patrón de trolox por el método de ABTS.

Trolox mM	Abs1	Abs 2	Prom Abs	Dif Abs
0.0156	0.665	0.669	0.667	0.026
0.0312	0.65	0.64	0.645	0.046
0.0625	0.614	0.608	0.611	0.082
0.125	0.537	0.545	0.541	0.152
0.25	0.413	0.406	0.41	0.283
0.5	0.205	0.211	0.208	0.485

Figura 11. Curva de cuantificación de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

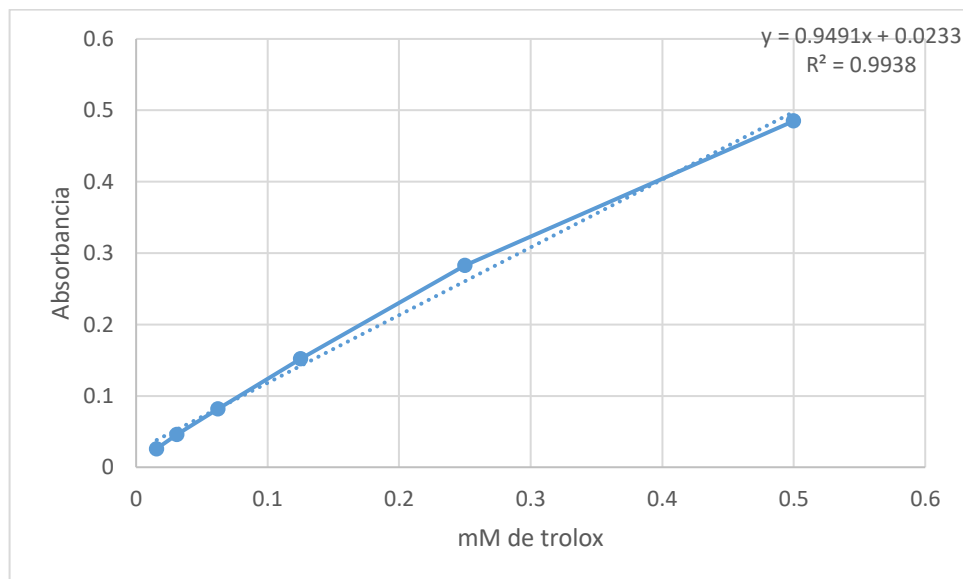
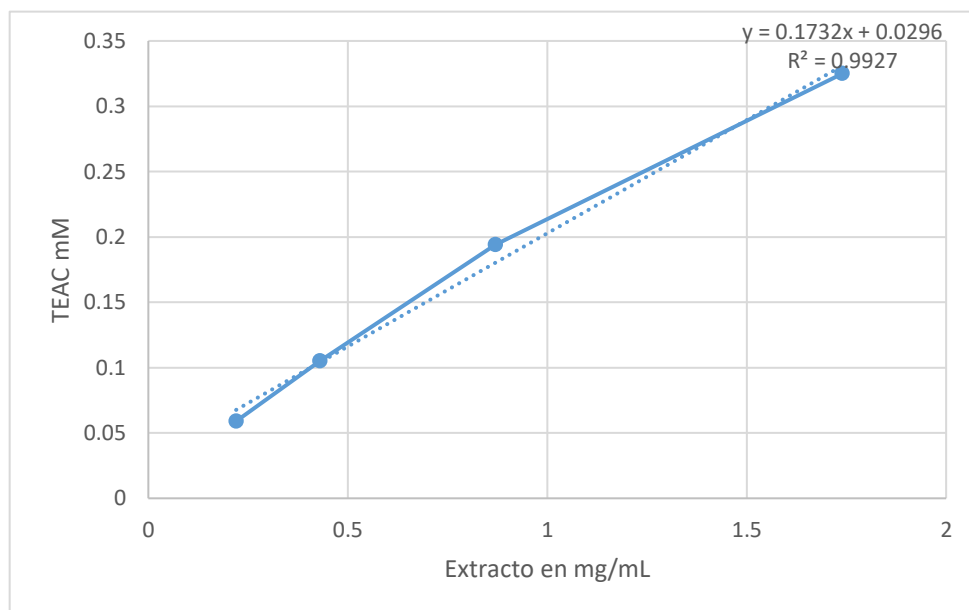


Tabla 6. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por el método ABTS.

mg/mL de					
extracto	Abs1	Abs2	Prom Abs	Dif Abs	TEAC
0.22	0.615	0.613	0.614	0.079	0.059
0.43	0.587	0.593	0.59	0.123	0.105
0.87	0.471	0.481	0.476	0.207	0.194
1.74	0.358	0.364	0.361	0.332	0.325
3.47	0.167				
Blanco	0.693				

Figura 12. Correlación entre concentración de extracto etanólico de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi” y capacidad antioxidante equivalente a trolox como milimoles.



Aplicando la ecuación de la curva: $Y = 0.1732x + 0.0296$ se obtiene:

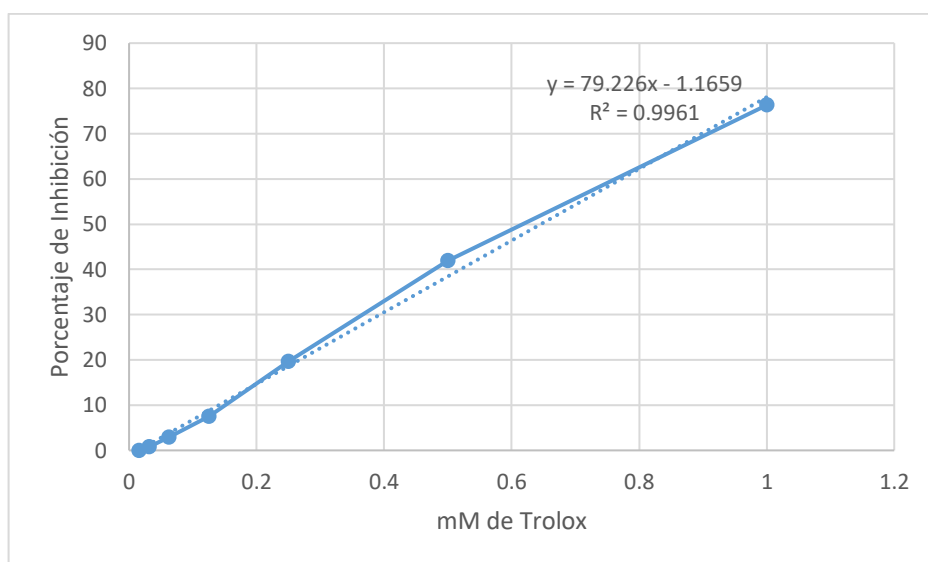
1mM de trolox equivale a 0,203 mg/mL

Tabla 7. Lectura de absorbancia de patrón de trolox por el método de DPPH

Trolox mM	Abs 1	Abs2	Prom	% Inh
0.0156	0.974	0.978	0.976	0
0.0315	0.967	0.968	0.968	0.82
0.0625	0.943	0.953	0.948	2.87
0.125	0.904	0.902	0.903	7.48
0.25	0.786	0.789	0.783	19.7
0.5	0.572	0.562	0.567	41.9
1	0.233	0.229	0.231	76.3
Blanco	0,976			

Figura 13. Correlación entre las concentraciones de trolox y % de inhibición del radical

DPPH

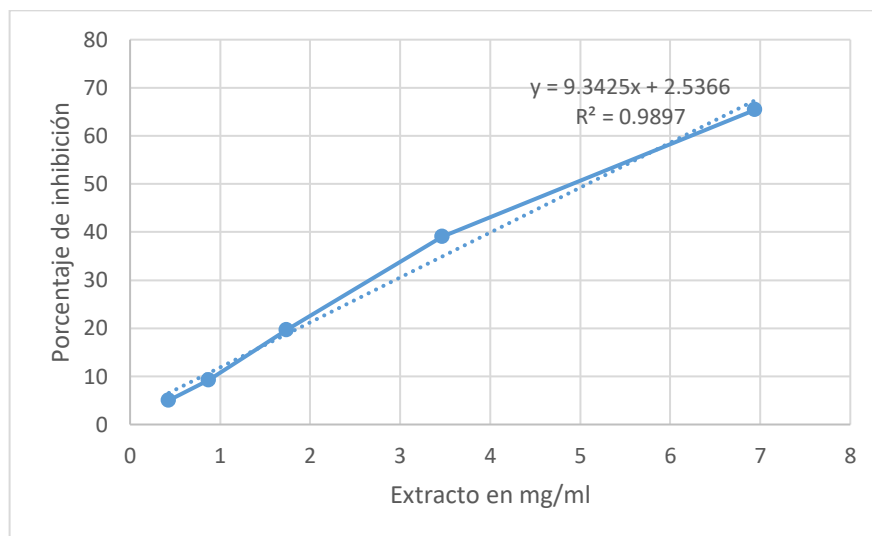


IC 50= 0,64 mM de trolox

Tabla 8. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” por el método DPPH.

Extracto				
mg/mL	Abs 1	Abs2	Prom	% Inh
0.43	0.927	0.926	0.927	5.02
0.87	0.886	0.880	0.886	9.22
1.74	0.78	0.788	0.784	19.7
3.47	0.56	0.590	0.595	39.5
6.94	0.337	0.336	0.337	65.4

Figura 14. Correlación entre concentración del extracto y porcentaje de inhibición



IC₅₀ = 5,08 mg

0,64 mM de trolox equivalente a 5,08 mg/mL de extracto

IV. DISCUSION

En el presente estudio se tuvo como objetivo general “Evaluar la capacidad antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” proveniente del distrito de Santiago de Chocorvos, Provincia Huaytará, Región Huancavelica”, teniendo en cuenta diversos aspectos y el uso tradicional que desde tiempos remotos y hasta la actualidad, pobladores de dicha zona siguen utilizando, desconociendo la existencia de estudios que respalden su valor farmacológico; a través de este estudio pretendemos dar a conocer las características fisicoquímicas, así como metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de esta especie; teniendo en cuenta que estos metabolitos pueden variar según una serie de factores agronómicos y ambientales, por ende también sus propiedades atribuidas.

El extracto etanólico se obtuvo por maceración con alcohol de 96° durante 15 días, el cual presentó las características de pasta densa y viscosa, de color negro verdoso y olor suigénis caracterizados en la Tabla 1.

A este extracto se le realizó una caracterización fisicoquímica con el objetivo de establecer parámetros estandarizados del extracto para utilidades futuras; cómo podemos observar en la Tabla 1 se determinaron la humedad, cenizas, sólidos totales, sólidos solubles, pH entre las características sensoriales de color, olor y aspecto.

En la Tabla 2, se presentan los resultados de la determinación de metabolitos secundarios en diferentes fracciones obtenidas como resultados del screening fitoquímico aplicado en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”, teniendo como resultado la presencia de metabolitos secundarios: Grupos aminos libres, flavonoides, triterpenos, antraquinonas, catequinas, saponinas y alcaloides en nuestro estudio, estos resultados guarda relación con el estudio de Quispe Z. (2013) quien realizó extracción hidroalcohólica de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, demostró que los principales metabolitos activos correspondieron a los alcaloides y las lactonas, reportados como los más abundantes (+++), taninos, saponinas y aminos, de poca presencia (+), no obstante, a pesar

de encontrar similitud en los resultados, hubieron diferencias en relación al método usado en la extracción, el cual comprende extracción etanólico para el presente estudio y de extracción hidroalcohólica para el estudio de Quispe Z. (2013).

De igual importancia, guarda relación con el estudio realizado por Huamán N. (2015), quien identificó la presencia de flavonoides, alcaloides, triterpenos, taninos en las hojas de *Lupinus Mutabilis Sweet*. Los hallazgos encontrados confirman la presencia de metabolitos activos el cual a pesar de ser muestras de diferentes partes del Perú como Huancavelica en el presente estudio y de Ayacucho el estudio de Huamán N. (2015), esto no fue un indicador para que existan diferencias en los metabolitos encontrados en ambos estudios.

En la tabla 4 y figura 10 se muestran los resultados de la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aérea de *Lupinus Mutabilis Sweet* “tarwi” por el método de FRAP; donde se obtuvo como resultado un valor 1mM de trolox equivale a 0,750 mg/mL de extracto, este valor no se pudo comparar ya que en toda la literatura revisada no se encontró la determinación de dicha actividad por este método; sin embargo, pueden considerarse sustanciales en comparación con otros estudios, y debemos tener en cuenta que este método se basa en el mecanismo de transferencia de electrones simples.

En la tabla 6 y figura 12, se muestran los resultados de la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de la especie por el método del radical libre ABTS, donde se obtuvo un valor de 1mM de trolox equivale a 0,203 mg/mL, como podemos apreciar presenta un valor que difiere con lo reportado por Córdova et. al. (2020)

En la tabla 8 y figura 14, se muestran los resultados de la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de la especie por el método DPPH, donde se obtuvo un valor de 0,64 mM de trolox equivalente a 5,08 mg/mL de extracto, este valor difiere con los resultados reportado por Cordova et. al. (2020), sin embargo, se debe tener en cuenta que este autor trabajó con semillas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet*; Borja J. (2014) determinó la actividad antioxidante mediante el método DPPH de la misma especie que nuestro estudio

encontrando valores superiores de actividad antioxidante, se debe tomar en consideración que este autor trabajó con hidrolizados proteicos de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “tarwi”.

Durante el estudio debemos resaltar los antecedentes encontrados frente a los cuales se han comparado y tomado como referencia los resultados del presente estudio.

De los resultados podemos deducir que la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “tarwi” del distrito Santiago de Chocorvos, provincia Huaytará, departamento Huancavelica presenta características considerables que se deben tener muy en cuenta, así como su composición química y contenido de metabolitos.

V. CONCLUSIONES

Culminado el presente estudio titulado: Determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” podemos llegar a la conclusión:

- 1) La caracterización fisicoquímica para el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “tarwi” fue de 3.70 de pH, 84.68 g/100 g para sólidos totales, 3.70 °Brix para sólidos solubles, 0.85 g/100 g para cenizas.
- 2) Los metabolitos secundarios identificados en el screening fitoquímico del extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “tarwi” fueron: alcaloides, flavonoides, triterpenoides y/ o esteroides, antraquinonas, catequinas, saponinas y aminoácidos libres.
- 3) El extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “tarwi” evaluados por el método DPPH presento actividad antioxidante expresada como IC₅₀ de 5,08 mg. En la determinación de TEAC por el método de FRAP se puede expresar que 1mM de Trolox equivale a 0,750 mg/mL de extracto y para el caso del método ABTS la determinación de TEAC es que 1mM de Trolox equivale 0,203 mg/mL.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizando como referencia este estudio, realizar un análisis comparativo sobre la actividad antioxidante de extractos con diferentes polaridades.
- Determinación de la posible actividad antiinflamatoria considerando la importante actividad antioxidante por la presencia de un gran número de metabolitos que resultaron positivos a su identificación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo Romero P. "Estudio químico y actividad antioxidante en *Lepechinia Meyenii* (Walp)". Tesis Magistral. Lima: PONTIFICA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ, Lima.
2. Rufa Olórtegui M. , Dany Paredes A , Macedonio Villafán B. , Carlos De la Cruz M. "El Tarwi (*Lupinus mutabilis*) en Huaraz: aspectos socioeconómicos, nutricionales y culturales". Rev. Aporte Santiaguino 2010; 3(1): p. 125-127.
3. Quispe Barcena Z. Efecto biocida del extracto hidroalcohólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet "tarwi" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say "zancudo". Tesis. Ayacucho: UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL.
4. Borja Lozano J. "Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus* sp.". Tesis. Lima: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, Lima.
5. Huamán Campos N. "Biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*". Tesis. Ayacucho: UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA, Ayacucho.
6. Garcia Aguirre G. "Determinacion del efecto del desamargado y fermentado en el contenido de compuestos con capacidad antioxidante de tres variedades de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)". Tesis. Quito: UNIVERSIDAD CENTRAL DE ECUADOR.
7. Rosas Quina Y. "Eliminación de los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) por fluidos supercríticos (CO₂) con co-solventes". Tesis. Arequipa: UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA.
8. Córdova-Ramos J, Glorio-Paulet P, Hidalgo A, Camarena F. "Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuesto fenólicos totales del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino". Scientia Agropecuaria. 2020; 11(2): p. 141-145.
9. Arellano Martinez A. "Análisis nutricional y actividades biológicas de compuestos bioactivos derivados del chocho (*Lupinus mutabilis*)". Tesis. Ambato - Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.

10. Coronado H. M, Vega y Leon S, Gutierrez T. R, Vazquez F. M, Radilla V. C. "Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana". Revista chilena de nutrición. 2015; 42(2): p. 14-15.
11. Zabaleta A. "*Lupinus mutabilis* (tarwi). Leguminosa andina con gran potencial industrial". Primera ed. Lima: Fondo Editorial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
12. Tapia M. "El Tarwi, Lupino andino". Primera ed. Fondo Ítalo Peruano; 2015.
13. Mayor Oxilia R. "Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante". Revista del Instituto de Medicina Tropical. 2010; 5(2): p. 23-29.
14. Alomar MF. ANTIOXIDANTES: ¿captadores de radicales libres ó sinónimo de salud? [Internet]. Disponible en: <https://www.soarme.com/archivos/1324143195.pdf>
15. Speisky H. Antioxidantes fundamentales para la Salud: Editorial Indualimentos; 2006.
16. Zamora S. J. "Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud". Revista chilena de nutrición. 2007; 34(1).
17. Bender D, PhD. "Radicales libres y nutrientes antioxidantes". 30th ed.: McGraw Hill; 2016.
18. Carrilo Esper R, Diaz Ponce J, Peña Perez C, Flores Rivera O, Neri Maldonado R, Zepeda Mendoza A, et al. "Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico". Revista de la Facultad de Medicina (México). 2016; 59(1).
19. Radicales libres y estrés oxidativo: Causa principal de envejecimiento prematuro [Internet]. Disponible en: <https://clinicacentrogranada.blogspot.com/2012/01/normal-0-21-false-false-false-es-ja-x.html>
20. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Medicina Legal de Costa Rica. 2019; 36(1).
21. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. "Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad". Rev Invest Med Sur Mex. 2013; 20(3): p. 161-168.

22. Dorado Martinez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Revista de la facultad de medicina. 2003; 46(6).
23. Lock de Ugaz O. "Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos Naturales". Segunda ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru; 1994.
24. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity". LWT- Food Science and Technology. 1994; 28(1): p. 25-30.
25. Benzie I, Strain J. "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay". Analytical Biochemistry. 1996; 239(1): p. 70-76.
26. Arnao M, Cano A, Acosta M. "The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity". Food Chemistry. 2001; 73(2): p. 239-244.

VIII. ANEXOS



Figura 15. Limpieza de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 16. Fraccionamiento de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 17. Muestra de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi” para maceración.



Figura 18. Medición de solvente para maceración de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 19. Adicionando alcohol a la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 20. Macerando la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 21. Filtrando el macerado de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 22. Extracto etanólico seco de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 23. Fracción A de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 24. Fracción Insoluble de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 25. Fracción B de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 26. Fracción C de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 27. Fracción D de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”

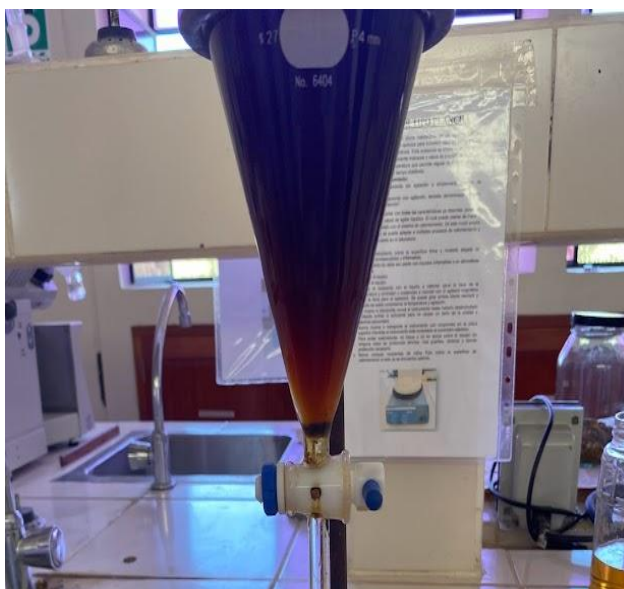


Figura 28. Fracción E de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”

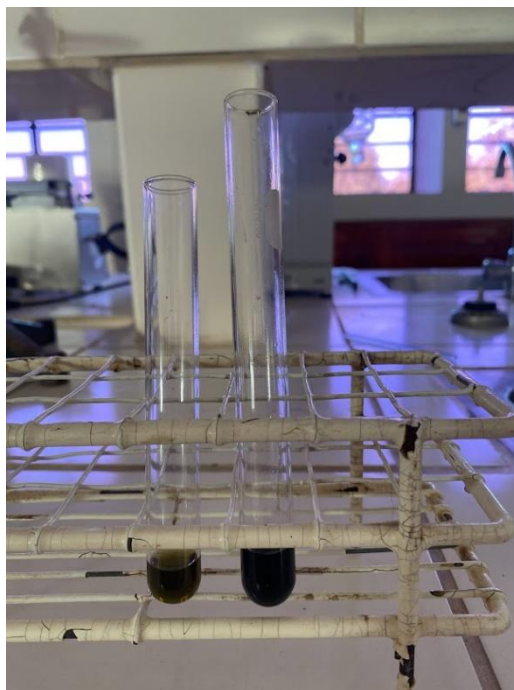


Figura 29. Identificación de taninos de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”

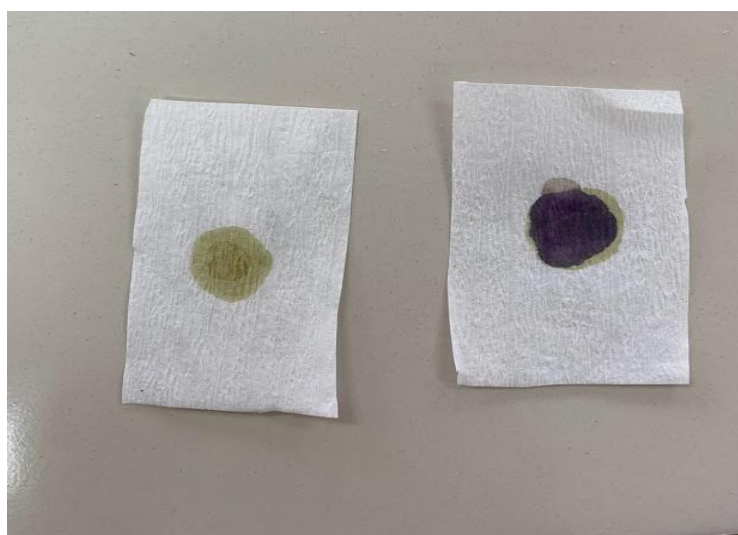


Figura 30. Identificación de aminoácidos de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 31. Identificación de flavonoides de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”

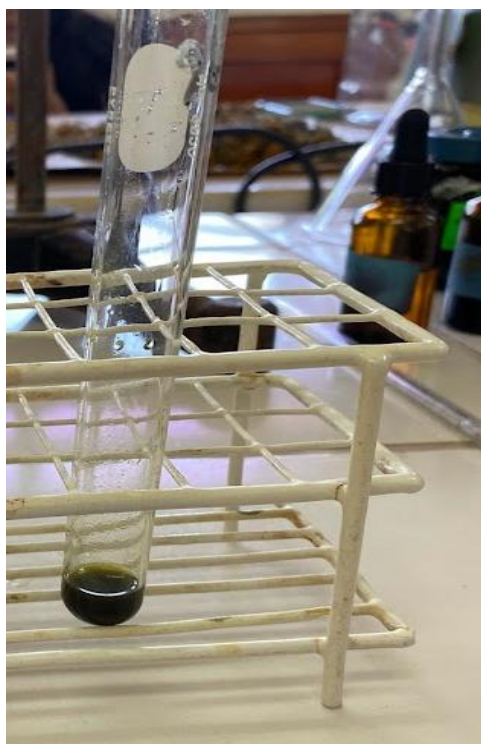


Figura 32. Identificación de cardenólidos de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 33. Identificación de catequinas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 34. Identificación de esteroides y triterpenoides de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 35. Identificación de alcaloides (reacción de Mayer) de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 36. Identificación de alcaloides (reacción de dragendorff) de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 37. Identificación de alcaloides (reacción de Hager y Wagner) de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 38. Identificación de saponinas de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet “Tarwi”



Figura 39. Determinación de sólidos totales de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



Figura 40. Determinación de cenizas de la especie *Lupinus Mutabilis Sweet* “Tarwi”



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

CONSTANCIA N°050-USM-NHN-2022

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

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de: Gleny **CARBAJAL SAIRITUPAC.**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional San Luis Gonzaga-Ica; ha sido estudiada y clasificada como: *Lupinus mutabilis* Sweet, y tiene la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016):

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Lupinus*

ESPECIE: *Lupinus mutabilis* Sweet.

Nombre vulgar: "tarwi".

Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

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

Lima, 15 de junio 2022

Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



JAC/ddb

Figura 41. Constancia de la certificación botánica de la especie *Lupinus Mutabilis* Sweet "Tarwi".