

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Bioquímica y Biología Molecular



**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS EN
TRES VARIEDADES DE *Lepidium meyenii* (MACA)**

Tesis presentada por la bachiller:
Paredes Fuentes, Julitza Lindsey

Para optar el Grado Académico de:
**Maestro en Bioquímica y Biología
Molecular**

Asesor:
Villanueva Salas, José PhD.

Arequipa – Perú
2018



Universidad Católica de Santa María

☎ (5154)251210 ☎ (5154)251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> 📍 Apto. 1350
AREQUIPA – PERÚ

“En la Ciencia y en la Fe esta nuestra Fortaleza para mayor Gloria de Dios”

Arequipa, 09 de octubre del 2018

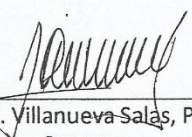
Señor Doctor,
José A. Villanueva Salas
Director de la Escuela de Postgrado,
Universidad Católica de Santa María.
Presente.

Ref.: Dictamen de Borrador de Tesis – Expediente 45197

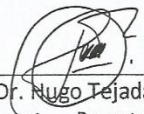
De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como DICTAMINADOR del Borrador de Tesis titulado **“IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE MACAMIDAS DE TRES VARIEDADES DE LEPIDIUM MEYENII (MACA)”** con el que la bachiller **Julitza Lindsey Paredes Fuentes**, pretende optar el Grado Académico de **Maestro en Bioquímica y Biología Molecular**, debo mencionar que realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, las mismas que han sido salvadas satisfactoriamente, considero se encuentra **APTO** para continuar con los tramites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de Postgrado.

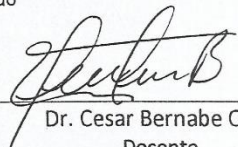
Atentamente,



José A. Villanueva Salas, PhD
Docente
Escuela de Postgrado

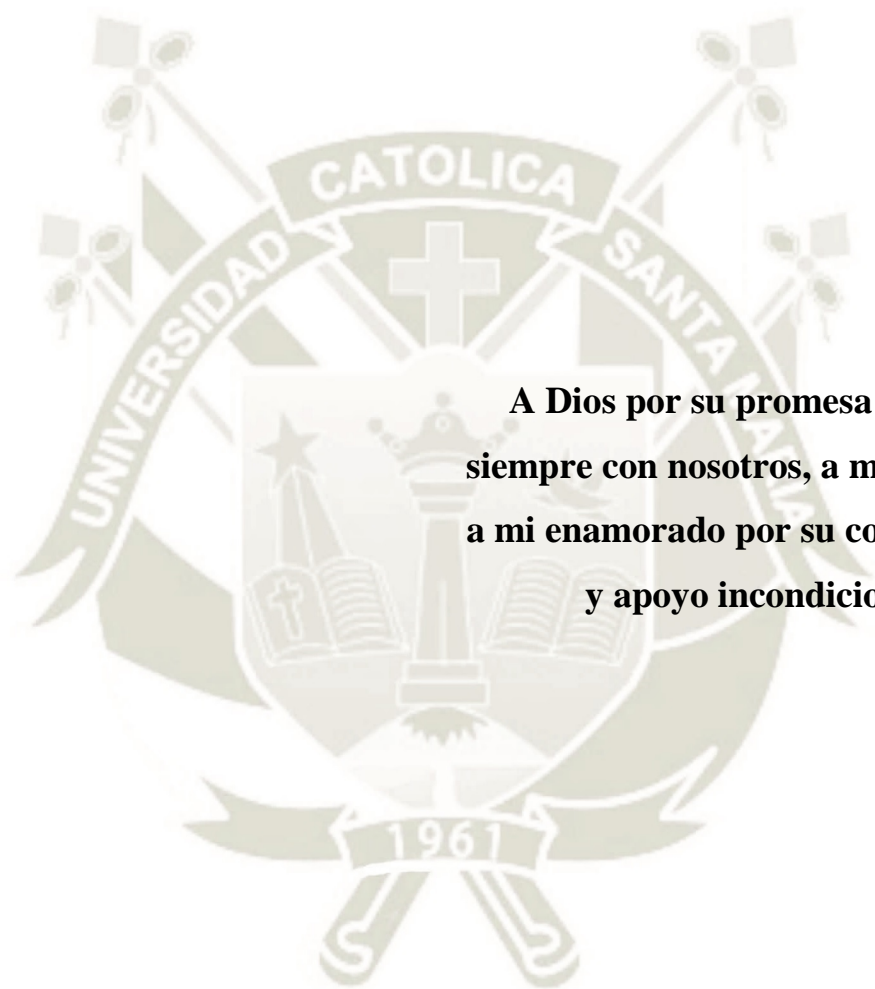


Dr. Hugo Tejada Pradell
Docente
Escuela de Postgrado



Dr. Cesar Bernabe Ortiz
Docente
Escuela de Postgrado

DEDICATORIA



**A Dios por su promesa de estar
siempre con nosotros, a mis padres y
a mi enamorado por su comprensión
y apoyo incondicional**

AGRADECIMIENTOS

Definitivamente a Dios, por ser mi Guía, mi Proveedor, sabes lo esencial que has sido en toda mi vida universitaria

A mis padres y a mi enamorado por su apoyo incondicional.

Al Dr. Benjamín Paz por la vocación, entrega y apoyo durante la maestría y el desarrollo del proyecto de investigación

Al Dr. Cesar Bernabé Ortiz, por el reto dejado en la asignatura de Seminario de tesis de la maestría de Bioquímica y Biología Molecular, que fue el punto departida para el desarrollo del presente proyecto y muchos más

Al Laboratorio de Investigación del Proyecto MERCURIO, por permitirme desarrollar el trabajo en sus instalaciones y en especial al Dr. José Villanueva Salas, por su apoyo incondicional y guía.

A mis amigos por sus consejos y por mantener nuestra amistad cada día más fortalecida.

A la Universidad Católica de Santa María, a la Escuela de Pos-grado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) que financio esta tesis mediante el proyecto CONV-000085-2014-FONDECYT-DE



RESUMEN

Lepidium meyenii (maca) es un recurso vegetal que ha alcanzado mucha relevancia en los últimos años debido a que muchas de las propiedades que la medicina tradicional le atribuía, han sido comprobadas científicamente. Es así que algunas de las propiedades verificadas o comprobadas son; el efecto sobre la espermatogénesis, efecto sobre el aprendizaje, actividad citoprotectora en condiciones de estrés oxidativo, función anti-proliferativa a nivel prostático.

Estas propiedades son atribuidas a los metabolitos secundarios que contiene, siendo uno de los principales compuestos conocidos las macamidas, que no son otra cosa que ésteres del ácido bencílico y sus derivados con ácidos grasos saturados e insaturados.

Como es conocido, las condiciones climatológicas y edafológicas pueden no solo influenciar en la cantidad de metabolitos secundarios presentes, sino que también pueden afectar el color de las raíces del vegetal. Esto da lugar a la existencia de diferentes ecotipos de *Lepidium meyenii*, encontrándose entre los más comunes las variedades, amarilla, roja y negra

En el presente trabajo se ha procedido a obtener extractos pentánicos por re-extracción continua líquido-líquido de extractos metanólicos de las 3 variedades mencionadas. En estos extractos ha sido posible la identificación y cuantificación de las siguientes macamidas; *N*-(3-metoxibenzyl) tetradecanamide (**1**), *N*-benzylhexadecanamide (**2**), *N*-(3-metoxibenzyl) hexadecanamide (**3**), *N*-benzyloctadecanamide (**5**), *N*-benzyltetracosanamide (**11**). Esto fue posible gracias a que el laboratorio de farmacología del MCPHs University donó los estándares correspondientes.

Esta cuantificación requirió un proceso de adecuación y estandarización de la técnica analítica cromatográfica con el fin de contar con resultados confiables, varios parámetros analíticos mostraron que el sistema cumple con los requisitos para un método validado. La respuesta del detector fue lineal en el rango de concentración de 0.25 a 50 µg/mL; con coeficientes de correlación mayores a 0.95, se obtuvo una precisión aceptable, con valores máximos de 4.097% para las concentraciones más bajas utilizada para el estándar (**11**) y (**1**); mientras que el resto está por debajo de 2%, los límites de detección y cuantificación variaron entre 0.10 y 0.64 µg/mL entre las macamidas analizadas y la exactitud fue evaluada al contaminar las muestras con una cantidad conocida de estándar, obteniendo un porcentaje de recuperación entre 80.91% - 101.26%.

La evaluación de los extractos, mostró la ausencia de la macamida (**11**) en las tres variedades analizadas. Adicionalmente, el contenido del resto de las macamidas analizadas fue menor en la maca negra y roja frente al de la maca amarilla. Cabe mencionar que la macamida más abundante fue la *N*-benzylhexadecanamide (**2**) en los tres ecotipos siendo en el extracto de maca amarilla donde se encontró la concentración más alta de *N*-benzylhexadecanamide (**2**), 58.14 ± 1.8 mg/g de extracto, mientras que en las otras dos variedades la concentración de la misma no superó los 20 mg/g de extracto. Adicionalmente mencionar que de las macamidas restantes se encontraron concentraciones inferiores a 3 mg/g de extracto

Palabras clave: *Lepidium meyenii*, macamidas, ecotipos



ABSTRACT

Lepidium meyenii (maca) is a plant resource that has been very useful in recent years because many of the properties of traditional medicine have been scientifically proven. Thus, some of the verified are; the effect on spermatogenesis, the effect on learning, the cytoprotective activity under conditions of oxidative stress, the anti-proliferative function at the prostate level.

These properties are attributed to the secondary metabolites they contain, being one of the main compounds known as the macamides, which are nothing but the esters of benzyl acid and its derivatives with saturated and unsaturated fatty acids.

As it is known, the climatic and pedological conditions can not be only influenced in the amount of secondary metabolites present, but they can also affect the color of the vegetable roots. This is the place of the existence of different ecotypes of *Lepidium meyenii*, being among the most common varieties, yellow, red and black.

In the present work, we have proceeded to obtain n-pentane extracts for the liquid liquid continuous extraction of extracts of the 3 varieties. In these extracts it has

been possible the identification and quantification of the following macamides; *N*- (3-methoxybenzyl) tetradecanamide (1), *N*-benzylhexadecanamide (2), *N*- (3-methoxybenzyl) hexadecanamide (3), *N*-benzyloctadecanamide (5), *N*-benzyltetracosanamide (11). This was possible thanks to the fact that the pharmacology laboratory of the MCPH University donated the corresponding standards.

This quantification requires a process of adequacy and standardization of the analytical chromatographic technique in order to have reliable results, several analytical parameters that meet the requirements for a validated method. The response of the detector was linear in the concentration range of 0.25 to 50 µg / mL; with correlation coefficients greater than 0.95, an acceptable precision was obtained, with maximum values of 4.097% for the lowest in the standard (11) and (1); while the rest is below 2%, the limits of detection and quantification vary between 0.10 and 0.64 µg/mL. The macamides analysed and the accuracy was evaluated by contaminating the samples with a known amount of standard, obtaining a recovery percentage between 80.91% - 101.26%.

The evaluation of the extracts, the absence of the macamide (11) in the three varieties analyzed. In addition, the content of the rest of the macamides analyzed was lower in the black and red maca compared to the yellow maca. The most detailed information was *N*-benzylhexadecanamide (2) in the three ecotypes found in the yellow maca extract where the highest concentration of *N*-benzylhexadecanamide (2) is found, 58.14 ± 1.8 mg / g of extract, while in the other two varieties the concentration of the same did not exceed 20 mg / g. Additionally mention that concentrations of less than 3 mg / g of extract were found in the remaining macamides.

Key words: *Lepidium meyenii*, macamides, ecotypes



INTRODUCCIÓN

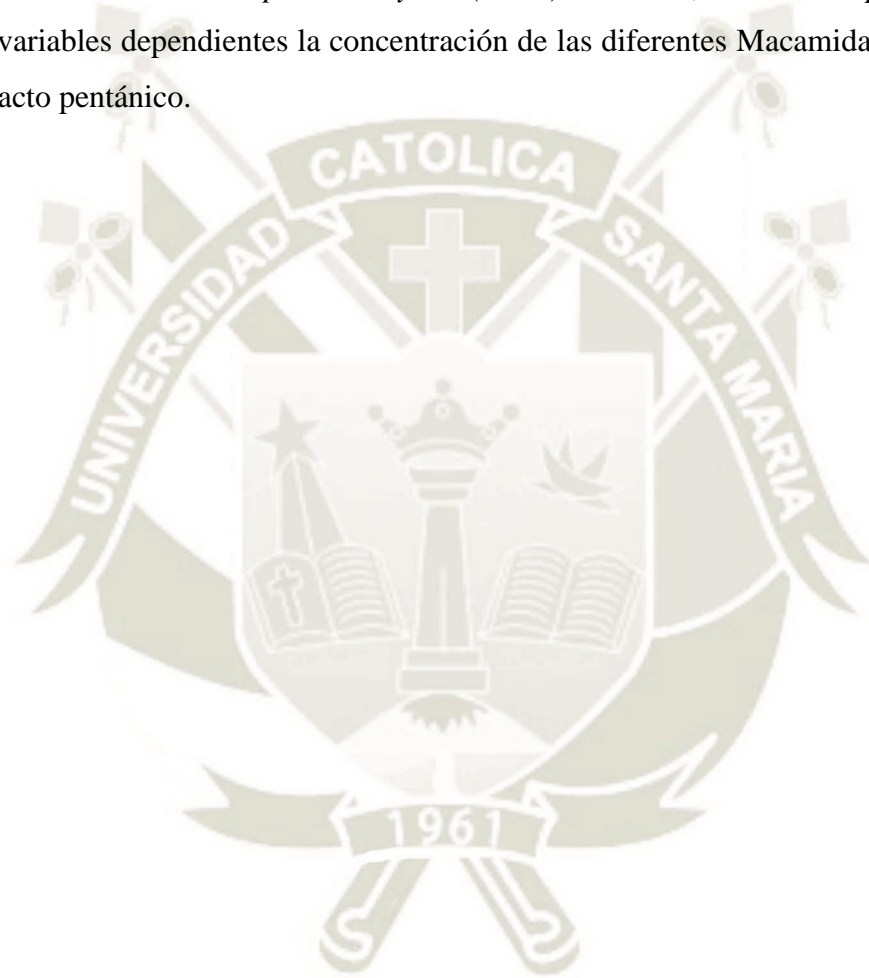
El uso de plantas medicinales en el mundo y en especial en nuestro País, que se caracteriza por una gran biodiversidad, se está incrementando día a día. *Lepidium meyenii* (Maca) está considerada como la planta peruana con un alto potencial de bioprospección. En la última década, la exportación de Maca aumentó en casi 5 veces a causa de la demanda de alimentos, en particular con beneficios para la salud, por lo que se considera que el estudio de plantas con estos potenciales es de interés.

Esta planta crece entre los 3000 a 4000 metros de altitud en diferentes partes de la sierra peruana, lo que influye en la cantidad de principios activos presentes en su hipocótilo, esto debido a factores edafológicos, atmosféricos y climáticos. De aquí nace la idea de determinar las macamidas, principios activos del *Lepidium meyenii* (Maca), en diferentes variedades de esta planta.

La cuantificación de las macamidas presentes en las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (Maca), nos permitirá en primer, lugar estandarizar el contenido de principios activos de los preparados a base de este hipocótilo, factor relevante para el uso medicamentoso de dicha planta medicinal. Por otro lado, nos permitirá recomendar la variedad con mayor contenido de principios activos no solo en su uso sino también para

su cultivo e industrialización. Finalmente, el contar con una técnica estandarizada para la identificación y cuantificación de macamidas nos permitirá controlar e identificar adulteración y falsificaciones en productos comerciales a base de este hipocótilo

El presente trabajo de investigación es comparativo, dentro del área de la bioquímica de las plantas con efectos farmacológicos. Tendrá como variables independientes las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (Maca) a analizar, así como su procedencia; y como variables dependientes la concentración de las diferentes Macamidas presentes en el extracto pentánico.



OBJETIVOS

- 1) Revisar las rutas biosintéticas que conducen a las macamidas en el *Lepidium meyenii* (Maca).
- 2) Obtener extractos pentánicos de las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (Maca).
- 3) Estandarizar el método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Performance para la determinación de macamidas.
- 4) Identificar y cuantificar macamidas en tres variedades de *Lepidium meyenii* (Maca).



HIPÓTESIS

Dado que la composición en metabolitos secundarios de una planta medicinal depende de su fenotipo es probable que las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (Maca) presenten diferente composición en macamidas

ÍNDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS	
HIPÓTESIS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	
CAPÍTULO I	1
Marco Teórico	1
<i>Lepidium meyenii</i> (Maca)	1
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	4
VARIEDADES	4
PRINCIPALES ASPECTOS BOTÁNICOS	6
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MACA	7
COMPUESTOS ACTIVOS PRESENTES EN LA MACA RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	8
PROPIEDADES Y USOS	15
CAPÍTULO II	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
MATERIALES Y REACTIVOS	18
2.1. Materiales de laboratorio	18
2.2. Insumos y reactivos químicos	18
2.3. Equipos e instrumentación	19
METODOLOGÍA	20

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	20
MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MACAMIDAS.....	20
DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS	22
CAPÍTULO III	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
OBTENCIÓN DE HIPOCÓTILOS DE MACA.....	32
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS PENTÁNICOS DE MACA	32
OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS	35
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS POR HPLC..	48
a) Linealidad.....	48
(b) Límite de detección y cuantificación	52
(c) Precisión.....	53
(d) Exactitud.....	56
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS EN LOS EXTRACTOS PENTÁNICOS	57
CONCLUSIONES	63
SUGERENCIAS	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

Ilustración 1. Ecotipos de Maca más representativos. ¹²	5
Ilustración 2. Estructuras de macamidas y macaeno del <i>Lepidium meyenii</i>	11
Ilustración 3. Gucosinolatos del <i>Lepidium meyenii</i>	12
Ilustración 4. Alcaloides del <i>Lepidium meyenii</i>	14
Ilustración 5. Esteroles del <i>Lepidium meyenii</i>	15
Ilustración 6. Hipocótilos triturados de <i>Lepidium meyenii</i> var. negra.....	20
Ilustración 7. Extracción metanólica por Soxhlet.....	21
Ilustración 8. Sistema de extracción continua líquido-líquido	21
Ilustración 9. Aromatogénesis en las plantas vía el ácido shikímico.	29
Ilustración 10. Biosíntesis de glucosinolatos.....	30
Ilustración 11. Ruta biosintética propuesta para las macamidas del <i>Lepidium meyenii</i> . ¹²	31
Ilustración 12. Hipocótilos de <i>Lepidium meyenii</i> de cada variedad	32
Ilustración 13. Extracto metanólico de maca negra.....	33
Ilustración 14. Equipo extracción continua líquido-líquido	34
Ilustración 15. Cromatograma obtenido con la primera Fase móvil probada	37
Ilustración 16. Cromatograma obtenido de la segunda Fase móvil probada.....	37
Ilustración 17. Cromatograma obtenido de la tercera Fase móvil proba.....	38
Ilustración 18. Cromatograma de los estándares eluidos con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : MeOH (65:35).....	39
Ilustración 19. Cromatogramas obtenidos con la diferentes proporciones de ACN-AcOH 0.1% : MeOH : H ₂ O	40
Ilustración 20. Cromatograma obtenido con una Fase móvil compuesta por ACN-AcOH 0.1% : MeOH : H ₂ O a través de 2 columnas Chromolith.....	41
Ilustración 21. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H ₂ O (90:10) y con dos columnas Chromolith	41
Ilustración 22. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H ₂ O (90:10) y con dos columnas Chromolith a flujo de 2mL/min	42

Ilustración 23. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H ₂ O (85:15) y con la columna Hypersil Gold	42
Ilustración 24. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H ₂ O (80:20) y con la columna Hypersil Gold	43
Ilustración 25. Cromatograma del extracto pentánico de maca disuelto en ACN con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H ₂ O (80:20) y con la columna Hypersil Gold.....	43
Ilustración 26. Cromatograma obtenido del extracto pentánico de maca disuelto en MeOH, con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H ₂ O (80:20) y con la columna Hypersil Gold	44
Ilustración 27. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-TFA 0.005% : H ₂ O-TFA 0.005% y con la columna Hypersil Gold	45
Ilustración 28. Cromatograma del extracto de maca diluido en MeOH con la Fase móvil ACN-TFA 0.005% : H ₂ O- TFA 0.005% y con la columna Hypersil Gold.....	45
Ilustración 29. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-TFA 0.005% : H ₂ O-TFA 0.005% y con la columna Hypersil Gold y flujo de 0.5mL/min.....	46
Ilustración 30. Análisis de las cinco macamidas con las últimas condiciones cromatográficas	47
Ilustración 31. Preparación de la curva de calibración.....	49
Ilustración 32. Cromatograma del análisis del extracto de maca roja.....	58
Ilustración 33. Pre- tratamiento de los extractos	59
Ilustración 34. Cromatograma del extracto de maca roja pre-tratado	59
Ilustración 35. Extractos pentánicos diluidos en metanol	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química contenida en 100 g de la parte comestible. ³	2
Tabla 2. Análisis bromatológico de la raíz seca de Maca ²⁰	8
Tabla 3. Macamidas y macaeno del <i>Lepidium meyenii</i>	10
Tabla 4. Macamidas sintéticas usadas como estándares.....	19
Tabla 5. Porcentajes de rendimiento obtenidos de los extractos pentánicos	35
Tabla 6. Primer ensayo de Fase móvil.....	36
Tabla 7. Segundo ensayo reportado de la prueba de Fase móvil.....	37
Tabla 8. Tercer ensayo reportado de la prueba de Fase móvil	38
Tabla 9. Tiempo de retención de cada estándar obtenidos con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : MeOH (65:35).....	38
Tabla 10. Ensayos con diferentes Fases móviles isocráticas.....	39
Tabla 11. Fase móvil propuesta por McCollom	44
Tabla 12. Fase móvil final	47
Tabla 13. Evaluación de la linealidad en un rango de 0.5 a 4 µg/mL	49
Tabla 14. Evaluación de la linealidad en un rango de 0.5 a 50 µg/mL	51
Tabla 15. Límite de detección y Límite de cuantificación	52
Tabla 16. evaluación de la repetibilidad del método.....	54
Tabla 17. evaluación de la precisión del método.....	55
Tabla 18. evaluación de la exactitud del método.....	57
Tabla 19. Evaluación de la concentración de macamidas en los extractos pentánicos ..	61



CAPÍTULO I

Marco Teórico

Lepidium meyenii (Maca)

Aunque la parte más importante de la Maca es su raíz tuberosa que fue domesticada en la época Pre-inca, por sus múltiples usos nutricionales y terapéuticos, se le ha descrito como una planta herbácea que pertenece al género *Lepidium* y a la familia *Brassicaceae*, a la cual también pertenece la mostaza.¹ Se considera que la mostaza, el nabo, la col, el berro de agua entre otras, son las plantas más relevantes, relacionadas con *Lepidium meyenii*. La maca pertenece a uno de los géneros más grandes de la familia *Brassicaceae*, las especies de América del Norte y Europa han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, el *Lepidium meyenii* de la región andina a fines del siglo pasado ha ganado interés debido a los grandes beneficios para la salud, siendo utilizada no solo como suplemento alimenticio, sino también por sus presuntas propiedades medicinales.²

Si se observan los datos recopilados por Olga Lock de Ugaz en 1993 (Tabla 1), ya se tenía cierta información sobre la calidad alimenticia de la Maca; sin embargo, esto no explicaba las propiedades terapéuticas atribuidas. En tal sentido se propuso, que estas radicaría en componentes químicos presentes en pequeñas concentraciones que aún no habían sido identificados, como es el caso de los metabolitos secundarios.³

Tabla 1. Composición química contenida en 100 g de la parte comestible.³

	maca	zanahoria	rábano	col	nabo
Agua, g	72.1	89.0	95.1	92.4	94.7
Calorías	104.0	41.0	14.0	24.0	16.0
Proteínas, g	3.9	0.6	0.8	1.5	0.6
Extracto etéreo, g	0.5	0.5	0.1	0.3	0.2
Carbohidratos, g	21.9	9.2	2.9	4.9	3.6
Calcio, mg	72.0	33.0	36.0	70.0	34.0
Fósforo, mg	53.0	16.0	29.0	69.0	34.0
Hierro, mg	4.3	0.5	1.0	0.4	0.1
Caroteno, mg	0.0	11.00	0.0	0.1	0.0
Tiamina, mg	0.5	0.04	0.01	0.3	0.01
Rivoflavina, mg	0.11	0.04	0.02	0.03	0.04
Niacina, mg	0.08	0.18	0.19	0.33	0.23
Ácido ascórbico, mg	0.8	17.4	18.6	48.5	21.1

La Maca se cultiva en zonas comprendidas entre 3000 - 4500 msnm; su principal hábitat es la región puna en suelos de pendiente moderada. Esta planta crece en un hábitat de intenso frío, luz solar extremadamente intensa y fuertes vientos, por lo que se considera que es resistente a la agresividad climatológica de continuas heladas, granizadas, nevadas, sequías hasta plagas.^{2,3}

Cuando se cultiva a bajas altitudes, ya no contiene cantidades significativas de macamidas. El área de cultivo tradicional está situada en una meseta a 4200 msnm.

alrededor del lago Chinchaycocha (Junín) en Perú.⁴ Aliaga y colaboradores en el 2011, especificaron que el cultivo de Maca está localizado en la Meseta del Bombón, específicamente en los distritos de Junín, Carhuamayo, Ondores y San Pedro de Cajas en la región Junín y en los distritos de Ninacaca, Vicco y Huayllay en la región Pasco, con un área potencial para el cultivo de 239,078 hectáreas, además alberga 510 comunidades campesinas con más de 48 mil habitantes.⁵ En 1998, la demanda de Maca aumentó considerablemente, resultando en nuevas áreas cultivadas en otras regiones de gran altura como Cusco y el área del Lago Titicaca. Por esta razón, la Maca puede encontrarse repetidamente plantada en los mismos suelos, a veces en rotación con diferentes cultivos y ocasionalmente con fertilización. Alternativamente, en respuesta a la nueva demanda, puede aparecer en suelos en los que no se había cultivado previamente. Estas diferencias en las características del suelo pueden dar lugar a diferencias en la calidad de la Maca, ya que su cultivo es generalmente percibido como una gran explotación de los recursos del suelo.⁴

Aliaga en 1999, recopiló información sobre las actividades de preparación para la temporada de siembra, la cual se realiza en los meses de octubre a noviembre por la proximidad de las precipitaciones pluviales; concluyendo cuando la mayor parte de las hojas de las plantas se tornan amarillentas producto de la madurez vegetativa y del quemado por parte del hielo; coincidiendo la cosecha con la época de las heladas de mayo a agosto.^{6,7}

La población nativa peruana de los Andes centrales usa los hipocótilos después de haber sido secados naturalmente y en cantidades > 20 g/d. No hay informes de reacciones adversas después de consumir *Lepidium meyenii* en los alimentos. Sin embargo, los nativos de las tierras altas del Perú recomiendan que la Maca se hierva antes de su consumo porque la Maca fresca puede tener efectos adversos sobre la salud.²

Obregón (1999), reporta que entre los estudiosos del género *Lepidium*, el Dr. Walpers realizó la primera descripción de la especie *Lepidium meyenii* Walp, en 1843 aproximadamente, la cual fue hecha en base a un espécimen colectado por el Sr. Meyenii cerca de la zona de Pisacoma en Puno – Perú.⁸

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Su ubicación en el reino vegetal es la siguiente:^{3,8}

División	<i>Fanerógama</i>
Sub división	<i>Angiosperma</i>
Clase	<i>Dicotiledónea</i>
Sub-Clase	<i>Arquidamidea</i>
Orden	<i>Rhoedales</i>
Familia	<i>Crucíferas</i>
Género	<i>Lepidium</i>
Especie	<i>Lepidium meyenii Walp</i>

Indudablemente, el nombre más común es Maca, sin embargo, se le ha asignado los siguientes nombres; "GINSEG PERUANO" "MA.-CA" "MACCA" "MAHA"⁸

VARIEDADES:

El concepto de "ecotipo" fue sugerido por Turesson (1922) quien lo definió como una "respuesta genotípica de una especie a un hábitat particular"⁹ Odum y Barrett refieren que un ecotipo es: "una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, a un ambiente particular o a un ecosistema definido, con límites de tolerancia particulares, a los factores ambientales locales". Por lo que se podría decir entonces que el proceso de adaptación a un hábitat particular implica cambios genéticos.^{9,10}

Diferentes ecotipos de Maca se han descrito de acuerdo con el color de sus hipocótilos. Gonzales G. menciona que existen 13 ecotipos conocidos de Maca en la región de Junín en Perú.² Obregón en 1999 las clasificó de la siguiente manera: Amarillo , Rojo-amarillo , Amarillo-plomo-claro , Rojo-blanco , Blanco , Morado-plomo , Morado-blanco , Blanco-morado , Negro , Blanco-rojo , Amarillo-rojo , Plomo , Plomo-claro.⁸

Los más representativos son los ecotipos amarillo, rojo, morado, blanco y negro, tal como se muestra en la Figura 1. Tanto en Perú como en China, en la región de Yunnan, el ecotipo amarillo es el cultivar más frecuente y abundante.¹¹



*Ilustración 1. Ecotipos de Maca más representativos.*¹²

La variedad de factores ambientales (el entorno de siembra de Maca, incluida la altitud, clima y fertilidad del suelo y el mismo proceso de secado) no solo puede causar cambios en el color de la raíz de Maca sino que va a causar variaciones en la composición de la Maca¹¹ por lo que presentarán diferentes efectos como los que se mencionan a continuación: Yllesca (1994) muestra diferencias nutricionales entre ecotipos amarillo, rojo y negro,¹³ Gonzales y colaboradores encontraron que la Maca negra presentaba mayor efecto sobre la espermatogénesis en comparación con la Maca amarilla y roja.^{11,14} Rubio y colaboradores hallaron que la Maca negra mostraba mejor efecto sobre el aprendizaje latente en ratones ovariectomizados que la Maca amarilla y roja.¹¹ Gonzales y colaboradores encontraron que la Maca roja redujo significativamente el tamaño de la próstata ventral en ratas, más la Maca amarilla y negra no tuvieron el mismo efecto.^{15,16} Sin embargo, la producción diaria de esperma y el recuento de espermatozoides epididimarios mejoraron significativamente en ratas macho adultas tratadas con Maca negra y amarilla pero no con Maca roja.¹⁶

Gonzales-Castañeda y colaboradores en el artículo *Photoprotection against the UVB-induced oxidative stress and epidermal damage in mice using leaves of three different varieties of *Lepidium meyenii* (Maca)* encontraron que el extracto

hidroalcohólico de las hojas de Maca roja mostró la mayor actividad antioxidante, mientras que los ratones tratados con el extracto de Maca negra mostraron los niveles más altos de Superóxido dismutasa (SOD).¹⁷ Nole y colaboradores (2004) argumentaron que para sobrevivir en ese ambiente hostil, la Maca ha desarrollado adaptaciones que incluyen protección contra la radiación UV, y se ha demostrado que los extractos acuosos de hipocótilos de Maca amarilla previenen la hiperplasia epidérmica inducida por UV en la piel de las ratas.¹⁷

Por otro lado, Carla Gonzales y colaboradores en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (2010) encontraron que la Maca negra y la Maca roja tienen efectos protectores sobre la arquitectura ósea en ratas ovariectomizadas.¹⁸

PRINCIPALES ASPECTOS BOTÁNICOS

La Maca se cultiva predominantemente por sus hipocótilos y semillas. Los hipocótilos, que son la parte comestible de la planta, se pueden encontrar en una variedad de diversos colores que se extienden de color de blanco al negro, como ya se ha mencionado. Los hipocótilos de diferentes colores parecen estar correlacionados con las diferencias en las concentraciones de los metabolitos secundarios y, por lo tanto, en su eficacia biológica.^{4,11}

Es una planta herbácea anual, con raíz de consistencia dura y napiforme (parte comestible) de 4 - 10 cm de longitud por 3 - 5 cm de diámetro en su parte ancha,⁴ constituye el órgano de almacenamiento con un alto contenido de agua. Después del secado natural, los hipocótilos se reducen drásticamente en tamaño a aproximadamente 2-8 cm de diámetro.²

Esta planta se caracteriza por la formación de una roseta de tallos cortos y decumbentes con numerosas hojas y que crece casi pegada al suelo. Sus hojas compuestas con vainas manchadas e inflorescencia. Las hojas de la Maca son generalmente dejadas en el campo después de la cosecha de los hipocótilos. Sin embargo, de las hojas secas se alimenta a veces al ganado y a los cobayos. Si se

puede demostrar que las hojas tienen efectos biológicos beneficiosos similares a los observados para los hipocótilos, las hojas de Maca pueden resultar ser una alimentación complementaria valiosa para el ganado.⁴

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MACA

El estudio de la composición de la Maca tiene evidencias desde 1961, donde Chacón realizó un estudio fitoquímico preliminar reportando la presencia de ácidos grasos, taninos, glucosinolatos y alcaloides.^{3,19} En 1999, Aliaga, compara el valor nutricional del hipocótilo seco de la Maca con cereales y granos como el maíz, arroz y trigo.^{5,7}

Los compuestos de interés en Maca, principalmente macaenos y macamidas, son específicos de esta planta, pero la Maca también contiene otros compuestos bioactivos tales como fitosteroles como campesterol y β -sitosterol, así como una gama de glucosinolatos. Estos metabolitos secundarios solos o en ciertas combinaciones pueden explicar las atribuciones de efectos biológicos al consumo de Maca.⁴

Las partes comestibles de la planta han sido utilizadas desde hace 2000 años como alimento básico de los pueblos y en los últimos años se ha difundido las propiedades que le dan realce a su valor nutricional. La composición de la raíz de Maca (*Lepidium meyenii Walp*) en polvo deshidratado se puede observar en la Tabla 2 donde los carbohidratos están compuestos 23,4% de sacarosa, 1,55% de glucosa, 4,56% de oligosacáridos y 30,4% de polisacáridos.²⁰

En 1994 Dini y colaboradores, exponen información sobre la raíz de Maca donde pudieron encontrar entre 18 a 19 aminoácidos, de los cuales 7 de ellos son esenciales y su contenido es más alto que en las papas y zanahorias, resaltando además un contenido de Leucina, Valina y Lisina mayor a los 50 mg/g de proteína. El contenido de ácidos grasos insaturados, como linoleico y oleico es de 52.7% a 60.3% de ácidos grasos totales.²² Así mismo, García y colaboradores en el 2009, analizaron la presencia de minerales, encontrando por 100 g de materia seca de Maca: calcio 247 mg, fósforo 183 mg y hierro 14.7 mg.²³

Tabla 2. Análisis bromatológico de la raíz seca de Maca²⁰

Componentes	Contenido (%)
Proteínas	8.87 – 11.60
Lípidos	1.09 – 2.20
Carbohidratos	54.60 – 60.00
Fibra	8.23 – 9.08
Cenizas	4.90 – 5.00

COMPUESTOS ACTIVOS PRESENTES EN LA MACA RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Algunos investigadores atribuyen que las raíces de Maca contienen varios metabolitos secundarios de interés, incluyendo los macaenos y macamidas, glucosinolatos, alcaloides, ésteres de ácidos grasos y fitoesteroles.^{22,24,25,26}

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos químicos que no intervienen en los procesos metabólicos imprescindibles para la vida celular y de la planta en general, sin embargo, les otorga ciertas ventajas, ya que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. La acumulación de estos compuestos no estructurales se relaciona con las condiciones ambientales que tiene que soportar el vegetal por citar algunos ejemplos la falta de nutrientes, déficit de agua, la presencia de depredadores, suelen ocasionar el aumento de síntesis de sustancias de defensas basadas en carbono.²⁷ Por otro lado no podemos dejar de resaltar la distribución restringida de estos compuestos, es decir se sintetizan en pequeñas cantidades y no se encuentran en todo los grupos de plantas, sino que pueden estar limitados a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies.²⁷ Bryant y col. en 1995, confirmaron el balance carbono/nutrientes en especies que se desarrollaban en medios con baja disponibilidad de nutrientes, en las que se produjo un aumento en la concentración de taninos condensados, lignina, fenoles totales.²⁸

Las principales rutas de biosintéticas de los metabolitos secundarios se originan del metabolismo primario del carbono. La gran cantidad de compuestos conocidos como metabolitos secundarios, se clasifican en diversos tipos, sin embargo, se conocen 2 grupos de compuestos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas son los fenoles y los terpenos. Solo una tercera parte de especies conocidas contienen metabolitos basados en el nitrógeno, como alcaloides y glucosinolatos.²⁹

Se agrupan en cuatro clases principales. Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales. Compuestos fenólicos. Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. Alcaloides.²⁹

(i) MACAENOS Y MACAMIDAS

Los macaenos y macamidas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios presentes en la raíz de Maca. Éstos son ácidos grasos poliinsaturados novedosos ya que se les considera como marcadores químicos porque no han sido encontrados en otra especie de *Lepidium* e importantes para suplementos dietéticos.^{30,31,32,33,34} Se ha planteado que estos dos grupos de metabolitos secundarios, macaenos y macamidas, son los compuestos biológicamente activos de la Maca que participan en la mejora del rendimiento sexual.³⁵

Se han identificado en los tubérculos de *Lepidium meyenii*, las alcamidadas benciladas (Macamidas), *N-bencil-5-oxo-6E, 8E-octadecadienamida* y *N-benzylhexadecanamida*, así como el Macaeno (*5-oxo-6E, 8E-ácido octadecadienoico*)

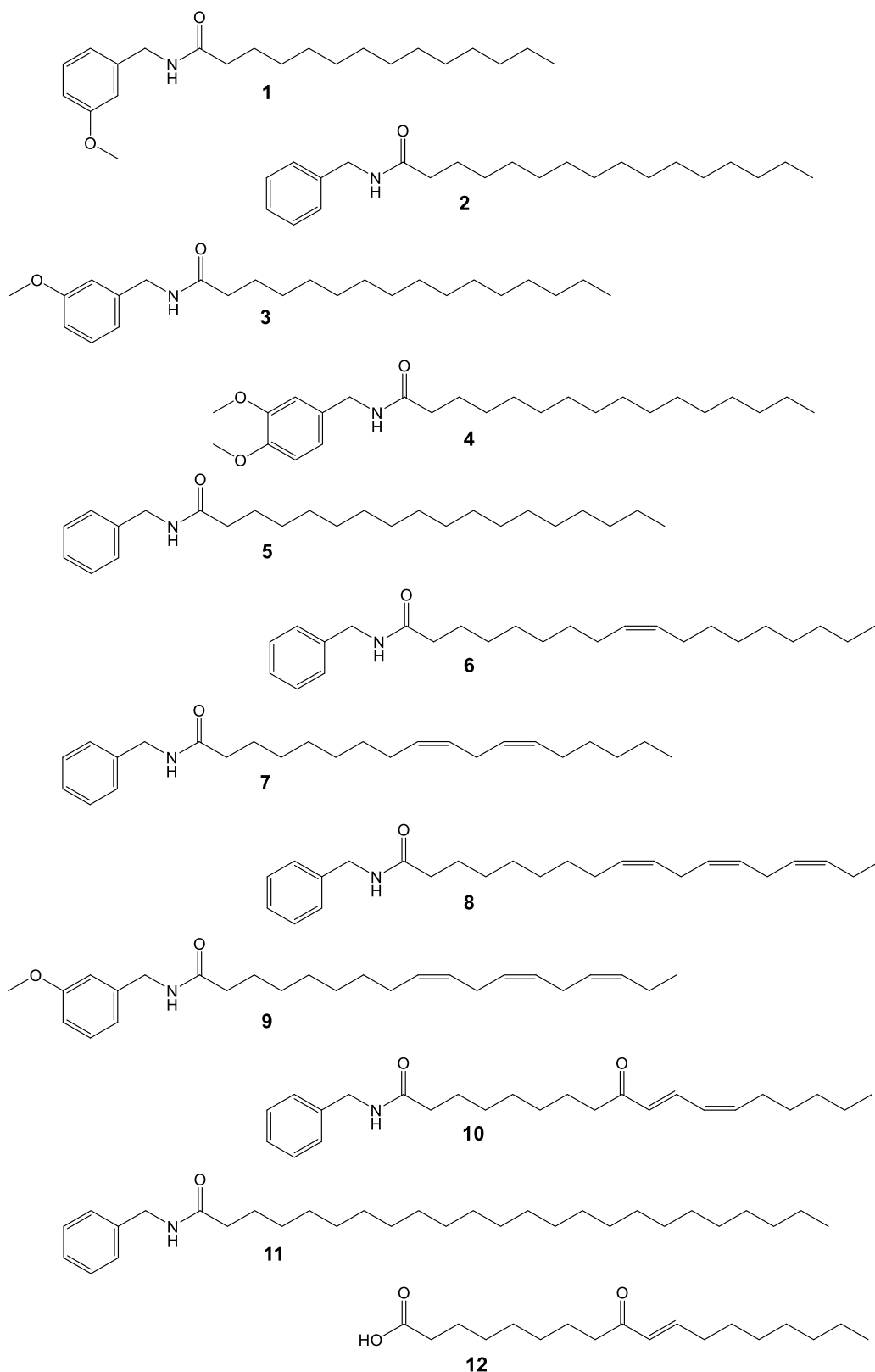
Estudios realizados por Ganzera y colaboradores (2002) informan que la composición porcentual de macaenos en una muestra de Maca seca varía entre 0,09% hasta 0,45%, y de macamidas de 0,06% a 0,52%.³³

Así mismo, Esparza et al (2015) realizó un análisis comparativo sobre el contenido de macamidas y sus precursores, mediante el método tradicional de secado al aire libre (4200m de altitud) durante nueve semanas, frente al secado en condiciones de laboratorio (liofilizador), concluyendo que los ciclos de congelación y descongelación en campo abierto durante el secado involucran daño tisular dando como resultado la maceración de tejidos y la liberación de ácidos grasos libres del almacenamiento lo altera los perfiles químicos y genera metabolitos bioactivos ausentes del material recién cosechado, encontrando $11.9 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$ de las macamidas (**2,8 y 9** según la Tabla 3) en la maca fresca liofilizada, mientras que en la maca secada de manera artesanal los valores fueron de $629.4 \pm 97.4 \mu\text{g/g}$ de maca seca.¹²

En la Tabla 3 y Figura 2, se muestran las principales macamidas presentes en el material vegetal, así como algunas sintetizadas a nivel laboratorio.

Tabla 3. Macamidas y macaeno del *Lepidium meyenii*

<i>N</i> -(3-methoxybenzyl)-tetradecanamide	1
<i>N</i> -benzylhexadecanamide	2
<i>N</i> -(3-methoxybenzyl)-hexadecanamide	3
<i>N</i> -(3,4-dimethoxybenzyl)-hexadecanamide	4
<i>N</i> -benzyloctadecanamide	5
<i>N</i> -benzyl-9Z-octadecenamide	6
<i>N</i> -benzyl-(9Z,12Z)-octadecadienamide	7
<i>N</i> -benzyl-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamide	8
<i>N</i> -(3-methoxybenzyl)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamide	9
<i>N</i> -benzyl-(9)-oxo-(10E,12Z)-octadecadienamide	10
<i>N</i> -benzyltetracosanamide	11
(9)-oxo-(10E)-octadecanoic acid	12



*Ilustración 2. Estructuras de macamidas y macaeno del *Lepidium meyenii**

(ii) GLUCOSINOLATOS

Los glucosinolatos o heterósidos sulfocianogénéticos son los metabolitos secundarios más importantes en la Maca³⁶ (Figura 3) y son considerados en gran parte responsables del sabor picante de Maca, habiéndose aislado nueve tipos de éstos metabolitos de los cuales la glucotropaeolina es el más abundante y la mayoría son de tipo aromático.^{1,26,37} Los científicos han centrado su interés en los glucosinolatos y sus productos derivados, debido a sus actividades biológicas, en particular propiedades anticancerígenas y capacidad para combatir patógenos.³⁸

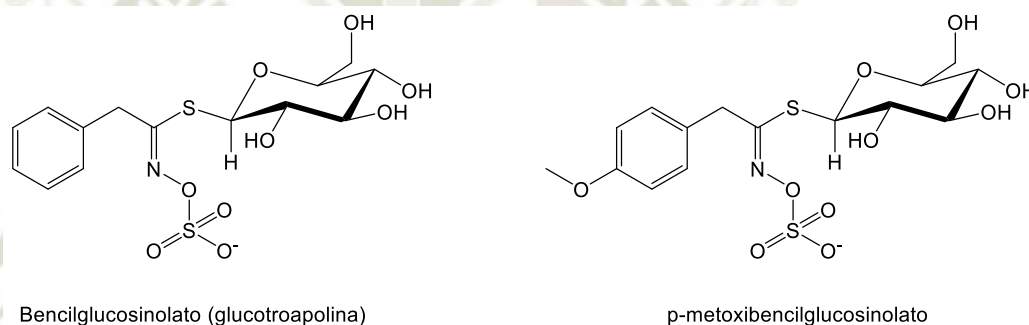


Ilustración 3. Glucosinolatos del *Lepidium meyenii*

Estudios realizados por Li y colaboradores (2001) informan que la composición porcentual de glucosinolatos en Maca fresca es alrededor de 1%, que a comparación de cultivos de crucíferas (col, coliflor y brócoli) es, aproximadamente, 100 veces mayor; pero este contenido varía decrecientemente en hipocótilos de frescos a secos.³⁷

Se ha comprobado que el contenido de glucosinolatos se encuentra en menor contenido en las raíces de Maca seca y productos procesados, en comparación al tejido y semilla fresca; debido que los glucosinolatos se pueden hidrolizar en presencia de la enzima Mirosinasa cuando las células se dañan.^{25,37} Otros estudios realizados vincularon la pérdida del contenido de glucosinolatos por

la Mirosinasa con la pérdida y la disponibilidad de agua, la estructura de la enzima y los factores que condicionaron su actividad. Las Mirosinasas están altamente glicosiladas con carbohidratos que representa hasta un 20% de su masa molecular.³⁹

Yábar y colaboradores (2011) realizaron un estudio sobre el contenido de glucosinatos analizándose mediante cromatografía líquida de alta resolución la actividad de la Mirosinasa evaluándose en ecotipos amarillo, rojo y negro de la Maca durante su pre-cosecha, cosecha y durante el secado después de la cosecha. Para ello identificaron en la cosecha seis glucosinatos; posteriormente evaluó la concentración para los tres ecotipos aumentando de forma gradual y significativamente durante los 90 días antes de la cosecha y durante los 15-30 días de secado después de la cosecha; esto fue seguido por una importante disminución de la concentración de glucosinatos durante el periodo de 30-45 días del secado post-cosecha debido a la fluctuaciones de la temperatura atribuyéndose una ruptura celular que se correlacionó con una acción de Mirosinasa.⁴⁰

(iii) ALCALOIDES

Los alcaloides forman parte principalmente en la naturaleza del reino vegetal en hojas, semillas, raíces y frutos; pero también se ha encontrado este compuesto en ciertos animales. Dentro de este grupo se han encontrado alrededor de 60 tipos diferentes de alcaloides de acuerdo con sus estructuras básicas. Estudios realizados han aislado tres tipos de alcaloides (Figura 4) provenientes de las raíces de Maca, de los cuales: dos alcaloides imidazólicos (A y B) lepidiline⁴¹ y un derivado bencilado de 1,2-dihidro-N-hidroxipiridina, llamado macaridina, que es un derivado bencilado de 1,2-dihidro-N-hidroxipiridina, mediante la metodología de análisis de espectroscopía de NMR y los compuestos aislados se visualizaron bajo UV.³⁴

Los alcaloides no son hormonas ni proteínas, éstos son sustancias nitrogenadas complejas, principios activos de vegetales, gozan de propiedades básicas. Los alcaloides de la Maca se combinan con los ácidos dando lugar a la formación de sales de alcaloides, éstos son cristalizables y solubles en el agua. Los alcaloides ejercen acción fisiológica sobre el organismo humano y animal, actúan en muy pequeñas cantidades, provocando efectos notables.

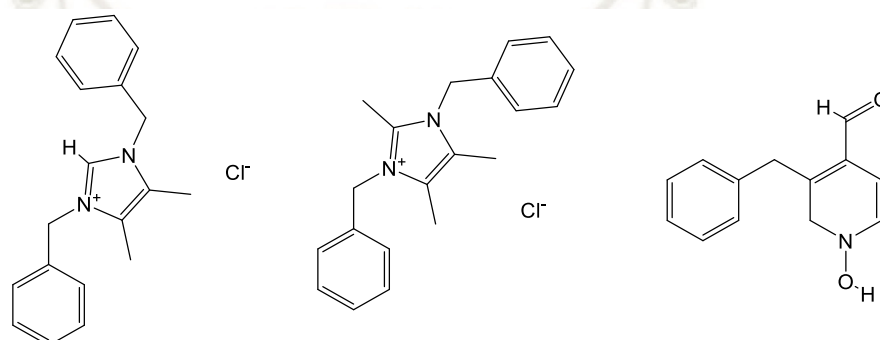


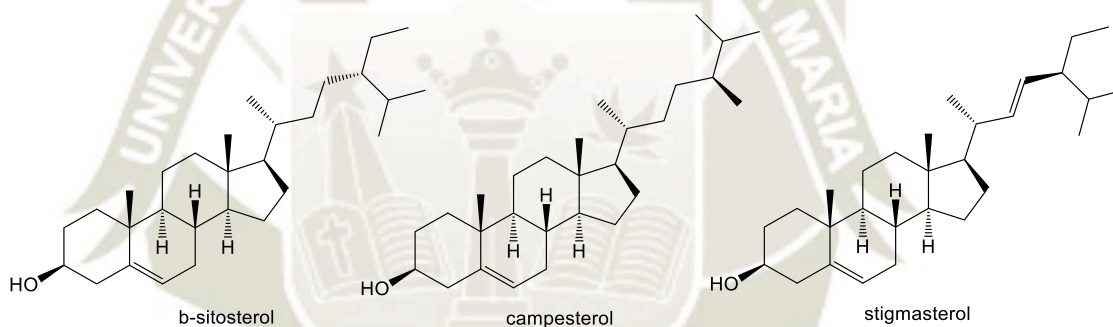
Ilustración 4. Alcaloides del Lepidium meyenii

Gracias al estudio de la acción estimulante del extracto alcaloideo de la Maca sobre el cerebro y el aparato reproductor femenino y masculino, se puede deducir de acuerdo a éstos análisis que ha habido una acción en la glándula pituitaria, encargada del aumento de peso y aceleración del impulso de la maduración sexual. Los hallazgos histológicos en ratas demuestran una clara y marcada estimulación de la maduración de los folículos en las hembras y en los machos se aprecia un aumento en la cantidad de espermatozoides, en los tubos seminíferos y aumentos de mitosis y espermatogonia. Su efecto sobre animales de laboratorio se ha mostrado positivo como alimentos y como fármaco con efecto benigno sobre la sangre y sistema reproductivo, confirmando así científicamente la creencia de la población andina de su bondad medical en toda la etapa de desarrollo humano y animal.¹⁹ Algunos autores han propuesto que los alcaloides presentes en la Maca pueden contribuir a la actividad anticancerígena.⁴¹ Hasta el momento no se ha llevado a cabo un estudio que

permite establecer la acción farmacológica de los alcaloides presentes en la Maca, los cuales por una naturaleza variada, pueden tener acciones diversas.

(iv) ESTEROLES

Zheng y colaboradores (2000) y Dini y colaboradores (1994) aislaron fitosteroles de Maca, que son compuesto bioactivos presente en gran parte de los alimentos vegetales por lo que se han informado más de 200 tipos diferentes, entre ellos β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Figura 5) como lo más abundantes.^{22,35} Se han planteado beneficios de los esteroides en Maca no sólo como reductores de colesterol en plasma, sino para: prevenir problemas menopáusicos, mejorar las posibilidades de fertilidad, propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.⁴²



*Ilustración 5. Esteroides del *Lepidium meyenii**

PROPIEDADES Y USOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, las propiedades que se le atribuye a la Maca, va a depender de la variedad y cantidad de principios activos presentes, los cuales están ligados al ecotipo del material vegetal.

Algunos autores apuntaron propiedades farmacológicas de la Maca en el sistema reproductivo con aumento de la fertilidad^{2,3,4,5}, en el rendimiento sexual y función eréctil⁶, en la disminución de la ansiedad y depresión en las mujeres después de la menopausia⁷, además de la capacidad estrogénica,⁵³ y presentó también, una función

anti-proliferativa en el cáncer de próstata^{14,15,54}. La administración de la Maca también redujo los efectos producidos por el estrés, con el aumento de los niveles de corticosterona, y otros parámetros relacionados como el tamaño de las glándulas suprarrenales y úlceras inducidas por estrés, hasta la disminución de los ácidos grasos libres y niveles de glucosa plasmática⁵⁵. La lipofilidad de muchos compuestos de la Maca sugiere actividad sobre el sistema nervioso, con eso, los efectos sobre el aprendizaje y memoria fueron estudiados en ratas ovariectomizadas⁵⁶ y en ratas con problemas de memoria inducida por escopolamina⁵⁷.

La Maca es rica en metabolitos vegetales secundarios, esto podría explicar los efectos biológicos que se le atribuyen²⁴. Los Macaenos y las Macamidas específicos de esta planta, son los principales compuestos activos^{35,37}. La Maca puede ser citoprotectora en condiciones de estrés oxidativo al eliminar radicales libres^{20,59}. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (en las formas de superóxido, radical hidroxil, peroxil, H₂O₂ y peroxinitrito) están implicadas en la etiología de las enfermedades degenerativas en función de la excesiva producción y liberación de neurotransmisores excitatorios, la Maca podría prevenir la formación de los ROS/RNS.²⁰

Sandoval y colaboradores en el estudio de la actividad *in vitro* de los extractos acuosos de maca frente al DPPH demostraron que tiene la capacidad de eliminar los radicales libres y proteger las células contra el estrés oxidativo.²⁰

Estudios realizados por Alejandro Pino profesor del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS), en Boston – EUA. demostraron la actividad neuroprotectora de los extractos de Maca *in-vitro*, en neuronas sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂ e *in vivo*, en ratas sometidas a accidente vascular cerebral isquémico. Se demostró que las Macamidas, los principales compuestos activos de la Maca, actúan a través del sistema cannabinoide, inhibiendo el Ácido Graso Amida Hidrolasa (FAAH), lo que sugiere que pueden actuar en el Sistema Nervioso Central contra el daño oxidativo en la protección de las neuronas^{21,22,23}, esto orienta a nuevas

investigaciones sobre los agentes de la Maca en la prevención y en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

McCollom y colaboradores (2005), analizaron las principales Macamidas en muestras de *Lepidium meyenii* por HPLC; en dicha investigación se consignaron cuatro muestras que fueron obtenidas de diferentes vendedores en Pisac-Perú, dichos hipocótilos fueron identificados, secados y pulverizados; para proceder a la extracción de los analitos con éter de petróleo en un shaker por 24 horas a 1500rpm, seguidamente los extractos fueron filtrados y evaporados a sequedad para el análisis cromatográfico.³¹

En el 2014, Chain y colaboradores de la Universidad de Tucumán-Argentina, analizaron el extracto no polar de los hipocótilos de *Lepidium meyenii*. Para ello se preparó un extracto a partir de 180g de hipocótilos silvestres secados a temperatura ambiente por el Método de Soxhlet con n-hexano, se evaporó el solvente y el extracto crudo fue sometido a una hidrólisis alcalina y el residuo se acetiló con anhídrido acético en piridina seca durante 24 horas. La cromatografía en columna (CC) del extracto acetilado produjo una fracción que contiene una mezcla de Macamidas las cuales se analizaron por LC-MS mostrando la presencia de 12 amidas.⁶⁴

En el 2016, Eliana Esparza y colaboradores, publicaron los efectos del proceso de secado en los niveles de las Macamidas bioactivas y de sus posibles precursores metabólicos durante el secado tradicional e industrial post cosecha. El secado del tejido vegetal, es un complejo proceso bioquímico en el cual el grado de daño a los tejidos y las reacciones subsiguientes durante la desecación determina la composición y viabilidad del producto. En este trabajo los diferentes tipos de muestra – hipocótilos fueron congelados con nitrógeno líquido y molidos, una porción de un gramo fue colocada en botellas de centrifuga de polipropileno que contenían H₂O-MeOH precalentado a 70 °C. Se colocaron en un baño de agua a 70 °C, con agitación, durante 1h. Luego se centrifugó durante 15 min, el sobrenadante fue filtrado al vacío para ser almacenado en tubos de cultivo de vidrio.¹²¹²



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y REACTIVOS

2.1. Materiales de laboratorio

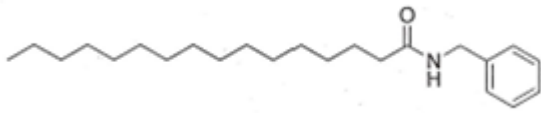
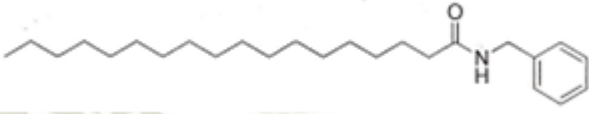
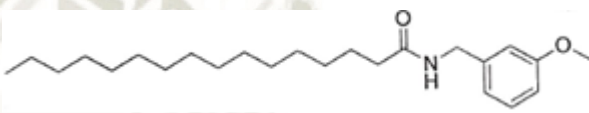
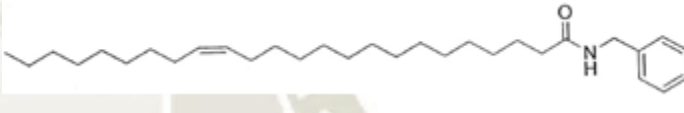
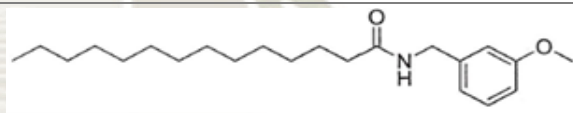
Para la preparación y evaluación de los extractos fue necesario el Equipo de Soxhlet, probeta de 500 mL, papel filtro, balón de 250 mL, Equipo de extracción líquido-líquido, matraces aforados de 2, 5 y 10 mL, filtros para jeringas (tamaño de poro de 0.45 μm), micropipetas de 20, 200 y 1000 μL , pipetas volumétricas de 2, 5 y 10mL, jeringas de tuberculina, tubos de ensayo.

2.2. Insumos y reactivos químicos

Los reactivos usados durante el desarrollo de la investigación fueron: metanol grado HPLC, pentano P.A. acetonitrilo grado HPLC, ácido trifluoroacético los cuales fueron obtenidos de la casa comercial Merck Peruana. Adicionalmente, se contó con 5 macamidas sintéticas (que se muestran en la Tabla 4) donadas por el

Profesor Honorario de nuestra Universidad, Alejandro Pino Figueroa, PhD compuestos que se corrieron como estándares.

Tabla 4. Macamidas sintéticas usadas como estándares

Macamida	Código de identificación	Estructura química
<i>N</i> -bencilhexadecanamida	(2)	
<i>N</i> -benciloctadecanamida	(5)	
<i>N</i> -(3-metoxibencil)-hexadecanamida	(3)	
<i>N</i> -bencil-tetracosenoicanamida	(11)	
<i>N</i> -(3-metoxibencil)-tetradecanamida	(1)	

2.3. Equipos e instrumentación

Los cromatogramas fueron obtenidos en el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución marca Hitachi Primaide, equipado con un detector de arreglo de Diodos (DAD), horno, bomba cuaternaria, autosampler y desgasificador de solventes, se utilizó una columna Thermo Scientific, Hypersil Gold (250x4mm, 5 μ). Adicionalmente fue necesario el uso del sistema de purificación de agua Ultrapura MilliQ, rotavapor, pHmetro Methrom, balanza analítica Satorius, Centrífuga.

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Los hipocótilos secos de *Lepidium meyenii* fueron colectados en el mes de octubre del 2015 del departamento de Junín – Perú. Para ello fue necesario un contacto quien envió 5 kg de maca seca de cada una de las variedades a evaluar, amarilla, roja y negra.

Los hipocótilos secos de forma artesanal llegaron en bolsa de papel, de los cuales se seleccionaron y separaron aquellos que presentaban algún deterioro en su estructura. El material restante fue separado y triturado con un equipo de molienda para la respectiva extracción por Soxhlet. De cada variedad se obtuvo alrededor de 300g de muestra triturada, la cual fue almacenada en bolsas ziploc.



Ilustración 6. Hipocótilos triturados de Lepidium meyenii var. negra

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MACAMIDAS

Para la obtención del extracto metanólico de la maca amarilla, se pesó 50g de la muestra triturada y se procedió con la extracción por el método de Soxhlet siendo el volumen de Metanol utilizado de 250 mL y el tiempo de extracción por 9 horas, tal como se observa en la Figura 7.



Ilustración 7. Extracción metanólica por Soxhlet

Posteriormente, se le adicionó volumen suficiente de agua destilada, para obtener un extracto metanólico-acuoso de 1000 mL, el cual se trasvasó al equipo de extracción líquido-líquido y se mantuvo en agitación constante, por otro lado, se colocó en el balón adyacente 250 mL de n-pentano y se procedió a calentar el solvente orgánico apolar, para provocar su evaporación y pueda entrar en contacto con la muestra y extraer los componentes lipofílicos como las macamidas, presentes en el. El sistema se muestra en la Figura 8.

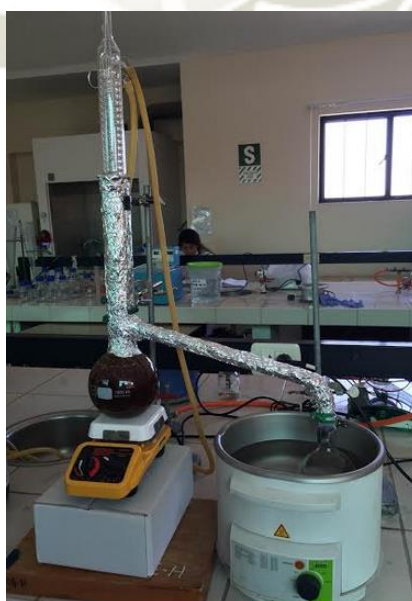


Ilustración 8. Sistema de extracción continua líquido-líquido

El extracto obtenido fue llevado a sequedad con ayuda de un baño maría hirviente y traspasado a un frasco de vidrio, ámbar, previamente pesado.

El mismo procedimiento fue llevado a cabo para las otras 2 variedades de Maca faltantes.

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS

Después de la preparación de los extractos pentánicos de cada variedad de Maca, se procedió a desarrollar un método analítico a través de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la determinación y cuantificación de las macamidas presentes en estos extractos pentánicos.

Como ya se mencionó, las macamidas a determinar, fueron donadas por el *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University (MCPHS), Boston – EUA*. De cada una de las 5 macamidas, se prepararon soluciones stock a 200 ppm en Metanol grado HPLC, las cuales fueron sonicadas por 3 minutos antes de ser enrasadas. Seguidamente se tomaron las alícuotas correspondientes para preparar un patrón de cada macamida a 10 ppm para poder encontrar la fase móvil adecuada para la identificación y cuantificación de las macamidas en los extractos pentánicos.

Los ensayos realizados con el Cromatógrafo Líquido, estuvieron en función de la columna (Fase estacionaria), los solventes (Fase móvil) así como la temperatura de la columna y del tipo de sistema (isocrático o en gradiente).

Una vez acondicionada la columna del HPLC con la fase móvil, se procedió a inyectar un volumen de 20 μ L de las soluciones anteriormente preparadas, para identificar la longitud de onda a la cual los analitos investigados absorban mayor cantidad de luz

Se realizaron las pruebas correspondientes para la determinación de la fase móvil, el flujo y tiempo de corrida. Seguidamente se procedió a la construcción de la curva de calibración y estandarización del método analítico.

Para preparar la curva de calibración, se tomaron las alícuotas correspondientes para preparar 6 patrones de un rango de 0.25 a 50.00 ppm en metanol, los cuales finalmente fueron pasados por filtros Anotop ® utilizando para ello jeringas descartables, las soluciones filtradas se colocaron en viales de vidrio de 1.5mL debidamente rotulados y colocados en el sistema de autoinyección.

Con el fin de estandarizar el método cromatográfico desarrollado se procedió a evaluar los siguientes parámetros:

a) Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.⁶⁶

Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado.

Con los resultados del estudio de linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente) y la respuesta y (variable dependiente). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como un recta de regresión del tipo⁶⁹ $Y=bx + a$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo **a** y **b** los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, **n** el número de mediciones, X_i la concentración e Y_i el valor medido en el ensayo *i*.

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}}$$

El valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre X e Y . En la práctica, r es generalmente mayor de 0.99 y los valores menores de 0.90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

b) Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación:⁶⁶

- Límite de detección: Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas y se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (porcentaje, ppm).⁶⁹
- Límite de cuantificación: Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en

condiciones experimentales indicadas, se expresa en forma de concentración de analito (% , ppm) en la muestra.⁶⁹

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero:⁶⁶

Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: **b**

Se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl} .

Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto anterior, se calcula la recta correspondiente a concentración vs desviación estándar y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del blanco.⁶⁶

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco para **n** medidas individuales como:⁶⁶

$$\text{Límite de detección} = LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

c) Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.⁶⁶

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ , estimada analíticamente por “s” o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). El estimador “s” de la desviación estándar se calcula como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo y \bar{X} el estimador de la medida poblacional μ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida).

d) Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado.⁶⁶

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la medida de la valoración y el valor verdadero aceptado.⁶⁹

Matemáticamente puede expresarse así:

$$\text{Recuperación. } R = \frac{\bar{X}}{X} * 100$$

Donde \bar{X} es el valor medio y X el valor verdadero.

Finalmente, se realizaron las pruebas correspondientes para la preparación de las muestras de cada uno de los extractos obtenidos, donde se ensayó con el uso de cartuchos de extracción de sílica. Una vez decidido el proceso se procedió a la cuantificación de las macamidas.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como fuera planteado en los objetivos del trabajo de investigación nos propusimos en primer lugar y como trabajo bibliográfico complementario el analizar y consolidar las rutas metabólicas que podrían dar origen a la presencia de macamidas en el *Lepidium meyenii* (maca) debiendo mencionar que la presencia de estos metabolitos secundarios en los hipocótilos de *Lepidium meyenii* (maca) se encuentra influenciada por las diferentes variedades pero también por el tratamiento post cosecha donde se ha visto que se producen en mayor cantidad.¹²

Cabe resaltar que si bien el metabolismo secundario en las plantas está ampliamente estudiado y se ha dilucidado la mayoría de rutas metabólicas que los originan, existen muchas otras rutas que están en duda y no han podido todavía ser comprobadas fehacientemente. Es así que por ejemplo la ruta del ácido shikímico que termina por dar lugar a la formación de anillos aromáticos, componentes fundamentales de muchos componentes primarios y secundarios como son los aminoácidos aromáticos y los

compuestos fenólicos, respectivamente, está ampliamente estudiada y ha sido verificada en diferentes especies, tal como se puede ver en la Figura 9.

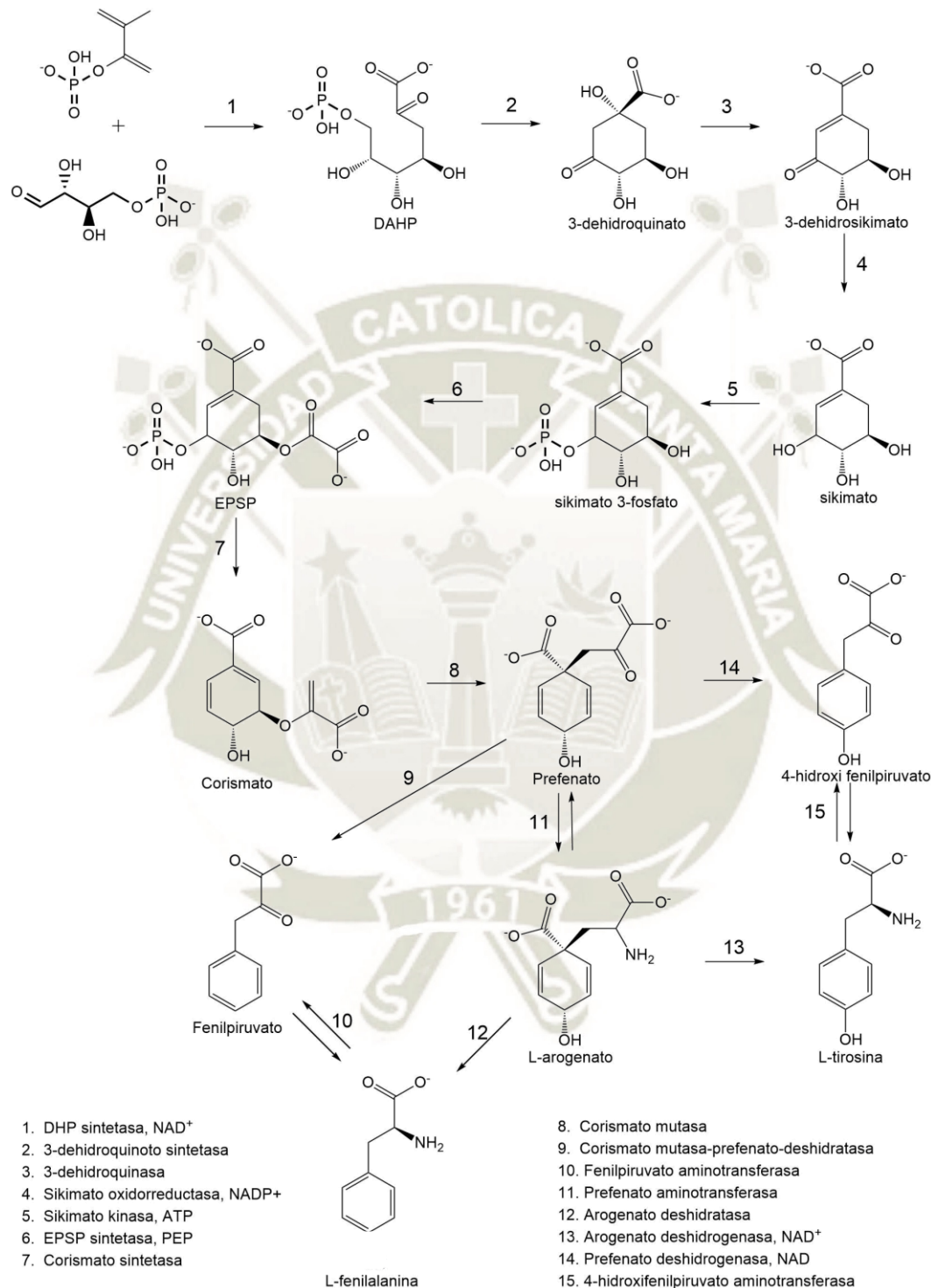


Ilustración 9. Aromatogénesis en las plantas vía el ácido shikímico.

Las enzimas descritas en la figura anterior ya son ampliamente conocidas y su actividad y rol en dicha vía bio-sintética ha sido comprobada.

Son los aminoácidos aromáticos los que después son utilizados para la biosíntesis de metabolitos secundarios como, los heterósidos cianogénéticos, glucosinolatos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, etc.

La ruta biosintéticas para la conversión de los aminoácidos aromáticos en glucosinolatos, puede ser observada en la Figura 10. En este caso en particular, las diferentes reacciones bioquímicas han podido ser estudiadas en una pequeña planta modelo cuyo nombre científico es *Arabidopsis thaliana* la cual ha despertado la curiosidad de buena parte de la comunidad científica. Se introdujo en el laboratorio hace unos 40 años y actualmente son miles los investigadores que cada día intentan descubrir los secretos que hay detrás de su desarrollo, crecimiento o floración. Su principal ventaja y que justifica la atracción que ejerce sobre los investigadores es que ya en el año 2000 se obtuvo la secuencia total de su genoma constituyéndose en el primer genoma de planta secuenciado.

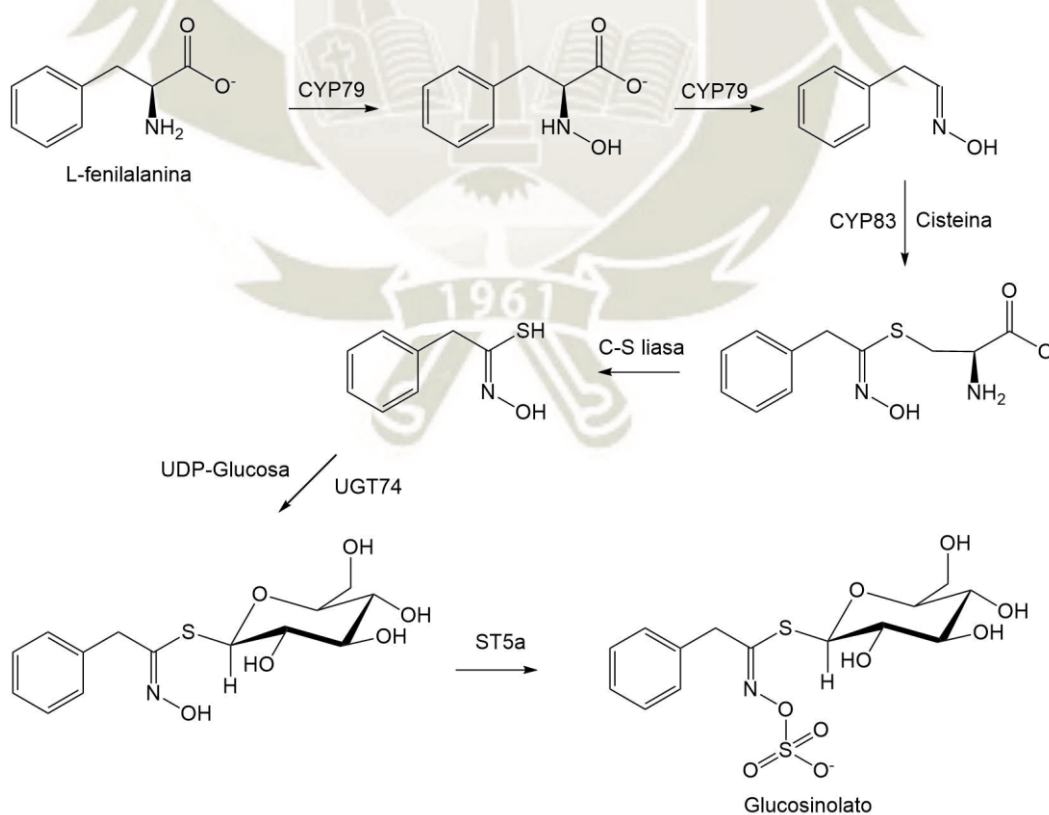


Ilustración 10. Biosíntesis de glucosinolatos.

Finalmente, el metabolismo de estos glucosinolatos hasta su conversión en macamidas ha sido propuesto, quedando en muchos casos por comprobar la actividad de las enzimas propuestas.¹²

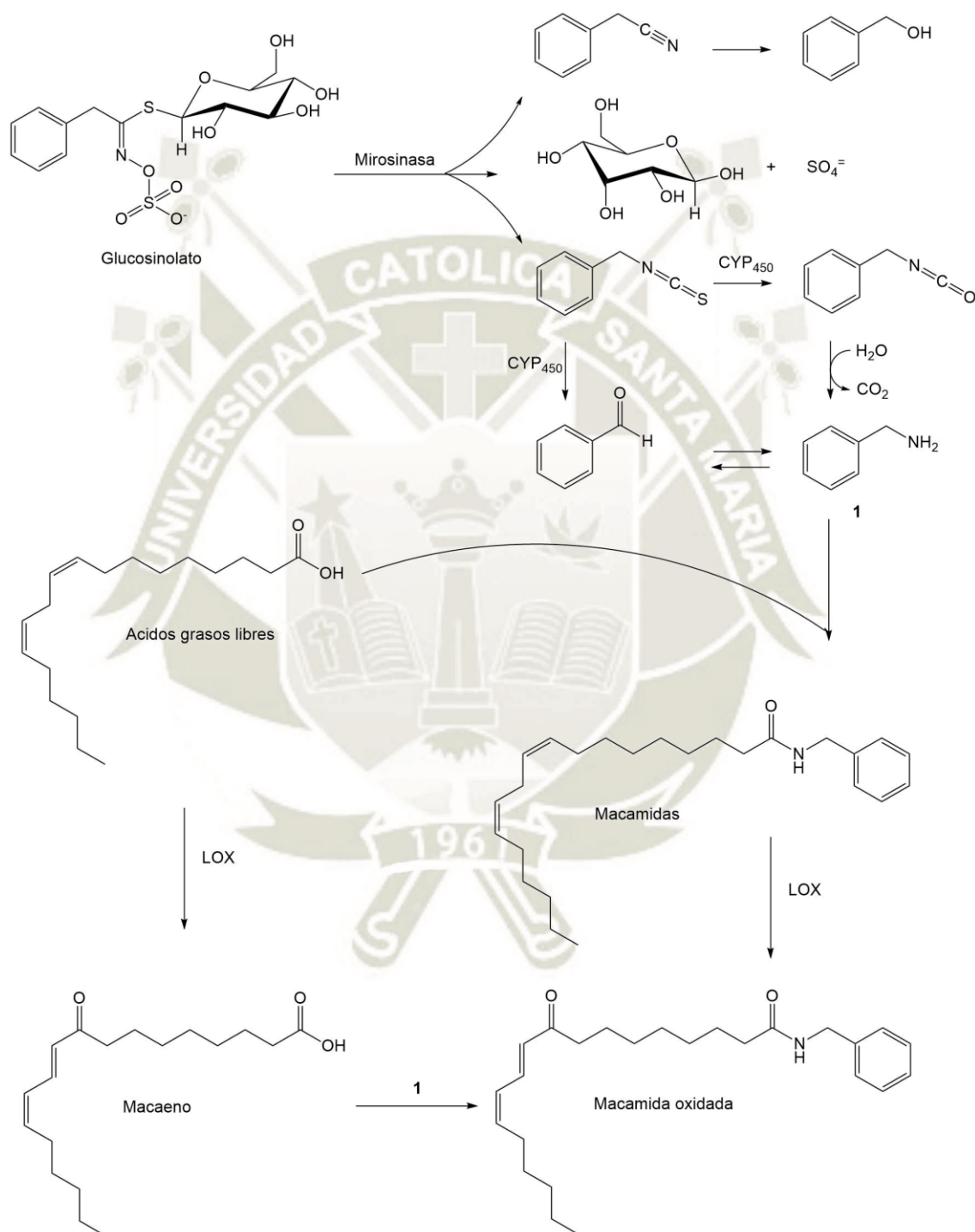


Ilustración 11. Ruta biosintética propuesta para las macamidas del *Lepidium meyenii*.¹²

OBTENCIÓN DE HIPOCÓTILOS DE MACA

Como se comentó en el acápite anterior se trabajó con tres variedades de maca; amarilla, negra y roja a fin de evaluar si existe diferencia significativa en el contenido de las 6 macamidas analizadas en la presente investigación. Para ello las muestras adquiridas fueron cultivadas y secadas en la localidad de Cerro de Pasco, provincia de Junín,

Los paquetes de cada variedad de maca solo contenían hipocótilos secos, de todo tamaño y sin polvo – tierra como se muestra en la Figura 12.



*Ilustración 12. Hipocótilos de *Lepidium meyenii* de cada variedad*

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS PENTÁNICOS DE MACA

Como se mencionó en el acápite anterior para la obtención de los extractos pentánicos, se procedió en dos etapas. La primera etapa constó en la preparación del extracto metanólico por el método de Soxhlet para lo cual se necesitó que la muestra fuera triturada, para ello se hizo uso de un equipo de molienda casero, pero dada la dureza y diversidad de tamaño de los hipocótilos, previamente, se tuvo que realizar una trituración en mortero de hierro para obtener un tamaño razonable y poder uniformizar el tamaño de partícula.

De cada variedad de maca, se pesó aproximadamente 50.0 g los cuales fueron empaquetados en papel filtro para colocarlo en el porta-muestra del equipo de Soxhlet y proceder con la extracción, como fue mencionado en el capítulo de materiales y métodos. El tiempo de extracción para cada sistema armado fue de 9 horas, obteniendo un extracto de color café oscuro intenso, de consistencia líquida, con olor característico, como se observa en la Figura 13.

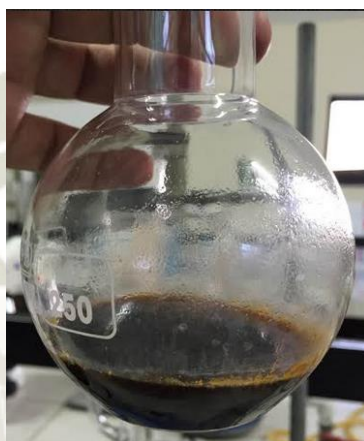


Ilustración 13. Extracto metanólico de maca negra

Una vez obtenidos los extractos metanólicos de maca, se inició con la segunda etapa, la re-extracción continua líquido-líquido con n-pentano. Para dicha extracción se utilizó un equipo diseñado por el equipo de investigación del Proyecto “Determinación de la actividad neuroprotectora de los extractos de *Lepidium meyenii* (Maca) y macamidas sintéticas, sobre la neurotoxicidad inducida por el péptido β -amiloide en células de neuroblastoma B-35 y sobre la expresión génica del péptido β -amiloide”. Como se observa en la Figura 14. está constituido por un recipiente principal (A) que presenta un brazo lateral que se conecta con el recipiente colector (B), un condensador (C), un baño termostático de agua y una plancha agitadora. El procedimiento se inició mezclando los 300 mL del extracto metanólico obtenido de cada variedad de maca con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL lo cual fue colocado en el balón (A), sobre el mismo se ajustó el condensador (C), además se le acomodó sobre la plancha agitadora, seguidamente se agregó 250 mL de n-pentano en el recipiente (B); se conectaron

ambos recipientes sumergiendo al contenedor del solvente orgánico en el baño termostático.

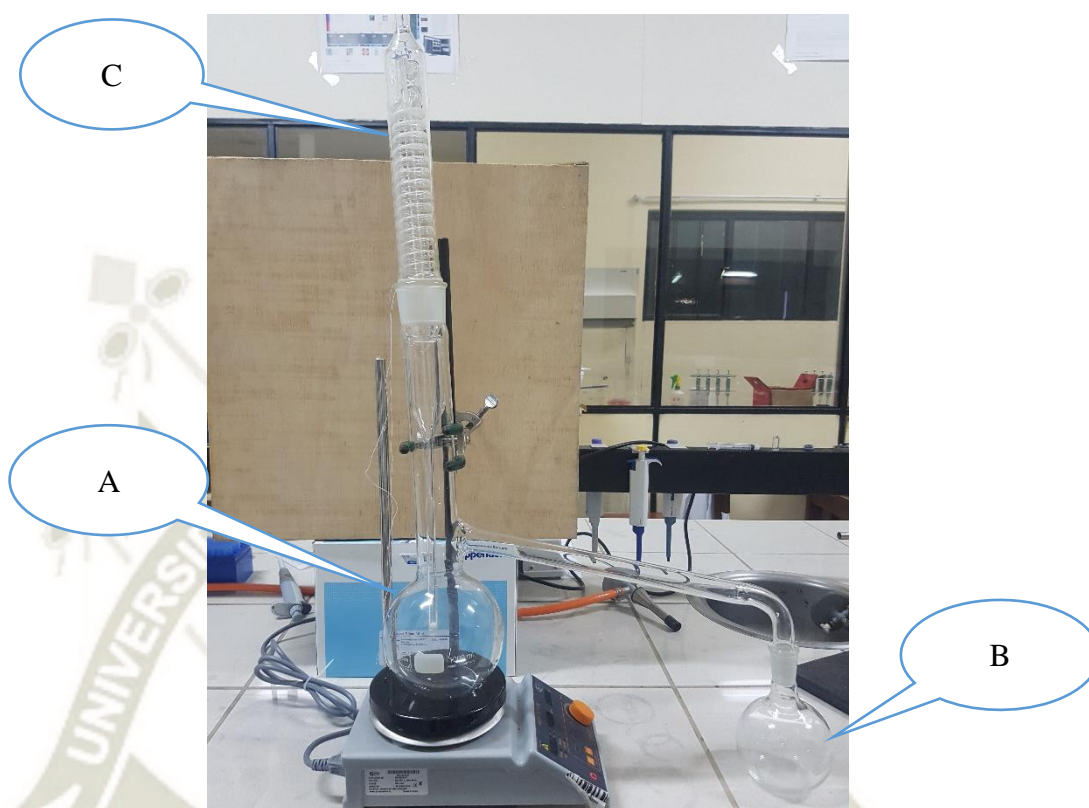


Ilustración 14. Equipo extracción continua líquido-líquido

Con el fin de que la distribución de calor sea uniforme todo fue cubierto con papel aluminio, como se muestra en la Figura 8, una vez hecho esto se procedió a calentar el solvente orgánico a 40°C, temperatura suficiente para que el n-pentano evapore y condense sobre el extracto metanólico y se proceda con la re-extracción de componentes como las macamidias, dicha mezcla era separada en el recipiente (B) ya que se observaba como el n-pentano iba adquiriendo color mientras transcurría el tiempo, la extracción culminó 24 horas después con la obtención de una suspensión oscura.

Una vez terminada la re-extracción, se procedió a evaporar del solvente orgánico, de esta manera se obtuvieron los extractos secos y se calculó los porcentajes de rendimiento que se observan en la Tabla 5, posteriormente fueron almacenados

en frascos ámbar, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El extracto tenía una apariencia pastosa, color café oscuro.

Tabla 5. Porcentajes de rendimiento obtenidos de los extractos pentánicos

Variedad de maca	Cantidad de muestra utilizada	Peso del extracto pentánico	Porcentaje de rendimiento
Maca negra	115.0 g	1.93 g	1.68%
Maca roja	110.0 g	1.90 g	1.72%
Maca amarilla	110.0 g	2.21 g	2.01%

OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS

Previamente se realizó una búsqueda bibliográfica, la cual fue base de inicio para la obtención de las condiciones necesarias para la detección de macamidas por HPLC

Las primeras pruebas fueron realizadas con una columna RP-18e Chromolith Performance (Merck), probándose diferentes proporciones de cada solvente ya sea de forma isocrática o en gradiente, las lecturas obtenidas en un rango de longitudes de onda entre 190 y 350 nm, a temperatura ambiente, con una fase móvil compuesta de:

- Agua
- Acetonitrilo – ácido acético 0.1%
- Metanol
- Agua – ácido acético 0.1%

A continuación, se muestran algunas de las diferentes pruebas realizadas durante la investigación.

La primera fase móvil probada fue en base del trabajo realizado por Ganzera y col. en el 2002, donde describe uno de los primeros métodos cromatográficos para la determinación de macamidas y macenos en *L. meyenii*.³³ En la publicación mencionan que los experimentos de prueba iniciales mostraron que la forma del pico y la separación de los mismos, mejora con una fase móvil ácida, mientras que una temperatura alta facilita la separación en un tiempo de corrida reducido.

En dicho trabajo se utilizó una columna Synergi MAX-RP 80 Å, 4µm de tamaño de partícula, una longitud de 150x4.6 mm; una fase móvil acidificada con 0.025% de ácido trifluoroacético (TFA) en gradiente (como se muestra en la Tabla 6) a un flujo de 1.0 mL/min; la detección fue realizada a: 210 y 280 nm; a una temperatura de 40 °C.

Sin embargo, dado que la literatura sugiere que el TFA es un reactivo para cromatografía de pares iónicos muy fuerte y que tiende a fijarse a los materiales de la columna haciendo que esta pueda ser usada solo con estas condiciones, es que se procedió a probar primero con ácido acético como se muestra en la Tabla 6, ambos solventes utilizados fueron acidificados con ácido acético (AcOH) 0.1%. Se mantuvo la proporción de la fase móvil probada por Ganzera, sin embargo, se utilizó una Chromolith RP-18 aumentando el flujo y bajando a 30°C la temperatura de la columna.

Tabla 6. Primer ensayo de Fase móvil

tiempo	ACN – AcOH. 0.1%	H₂O – AcOH. 0.1%	mL/min
0 min	55%	45%	2.00
15 min	95%	5%	2.00

Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 15, el empleo de la gradiente dificulta la visualización y resolución de los picos, dado que los picos obtenidos a los 12 minutos tendían a juntarse, adicionalmente de los 5 estándares solo se observó 4 picos, por lo que se realizaron modificaciones relacionadas a la proporción de cada solvente, sobretodo aumentando el porcentaje del ACN acidificado y dándole mayor tiempo de corrida, como se muestra en la Tabla 7, sin

obtener mejores resultados, por el contrario, pareciera que la resolución disminuyó, tal como se ve en la Figura 16

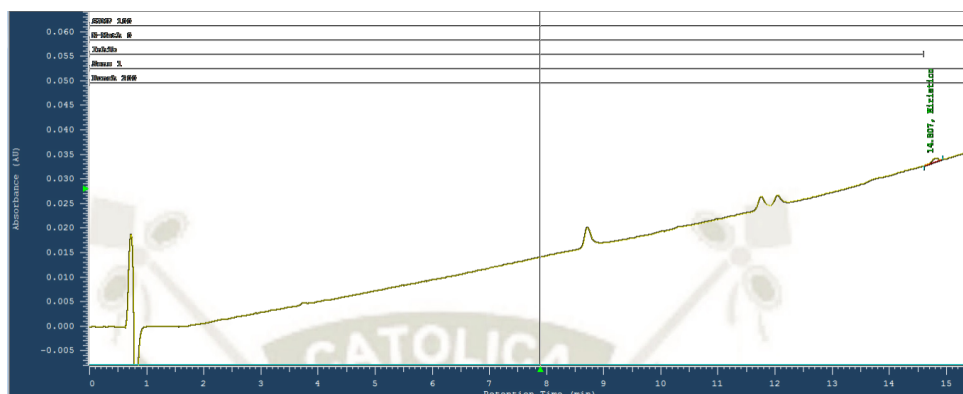


Ilustración 15. Cromatograma obtenido con la primera Fase móvil probada

Tabla 7. Segundo ensayo reportado de la prueba de Fase móvil

tiempo	ACN – AcOH. 0.1%	H ₂ O – AcOH. 0.1%
0 min	70%	30%
15 min	100%	0%
30 min	100%	0%

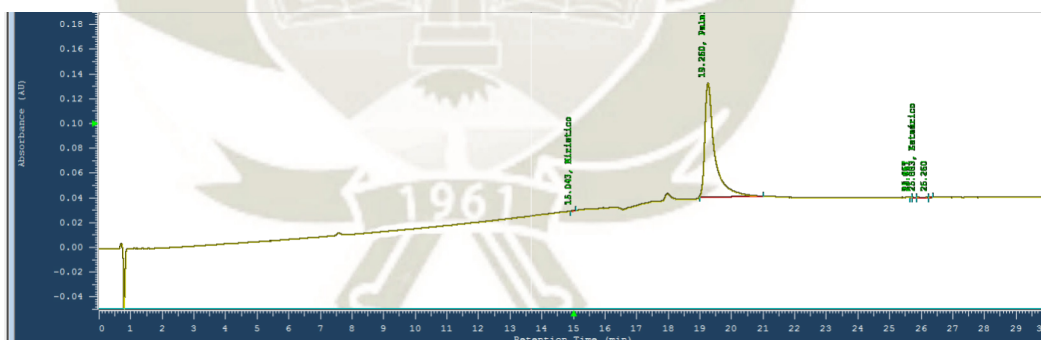


Ilustración 16. Cromatograma obtenido de la segunda Fase móvil probada

En las siguientes pruebas se añadió una pequeña porción de metanol (MeOH) para intentar perfilar los picos, este solvente iba aumentando durante la corrida mientras se dejaba de usar el agua acidificada de 5% a 10% en un plazo de 5 minutos, como se ve en la Tabla 8, sin embargo, ese pequeño cambio provocaba que las macamidias eluyeran muy rápido, como se puede observar en la Figura 17, el primer estándar tenía un tiempo de retención de 1.74 min. lo cual sería desfavorable al intentar

identificarlo en una muestra compleja, así como un poco resolución entre los siguientes picos mostrados.

Tabla 8. Tercer ensayo reportado de la prueba de Fase móvil

Tiempo	ACN – AcOH. 0.1%	MeOH	H ₂ O – AcOH. 0.1%
0 min	80%	10%	10%
8 min	90%	5%	5%
10 min	90%	10%	0%

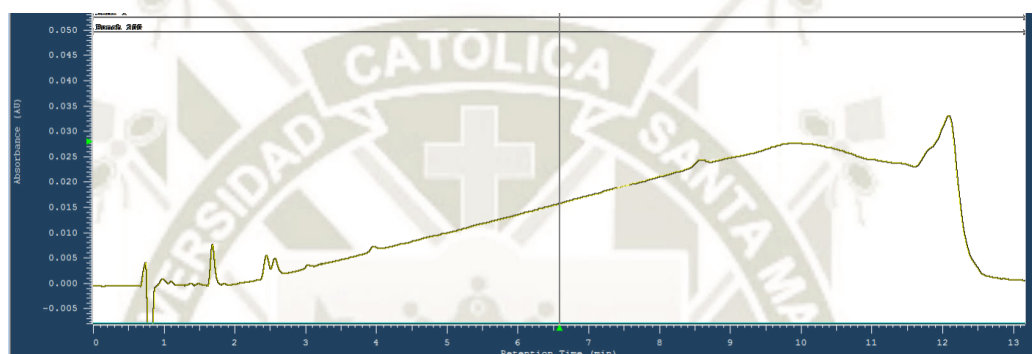


Ilustración 17. Cromatograma obtenido de la tercera Fase móvil proba

Después de varias pruebas, se realizaron corridas individuales de cada macamida a 10 µg/mL con una fase móvil isocrática compuesta por ACN AcOH 0.1% : MeOH en una proporción 65:35 y flujo a 1.5 mL/min. Obteniendo tiempos de retención (RT) como se muestran en la Tabla 9, donde se puede mencionar que, pese a la disminución del flujo, la *n*-(3-metoxibencil)-tetradecanamida (**1**) eluye antes de los 2 min., seguida de muy cerca por la *n*-(3-metoxibencil)-hexadecanamida (**3**) y la *n*-bencil hexadecanamida (**2**), estándares que no se llegan a separar. Finalmente se corrió un mix de dichos estándares, cromatograma que se observa en la Figura 18.

Tabla 9. Tiempo de retención de cada estándar obtenidos con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : MeOH (65:35)

	(2)	(5)	(3)	(11)	(1)
RT	1.80 min	2.3min	1.80 min	3.60 min	1.60 min

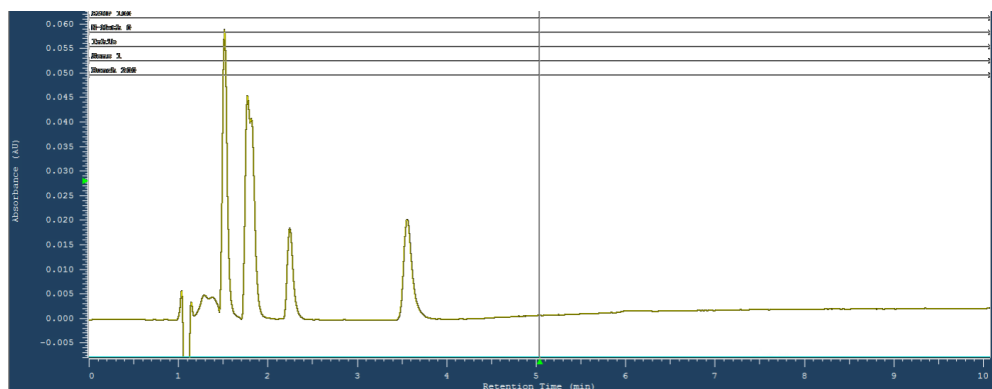


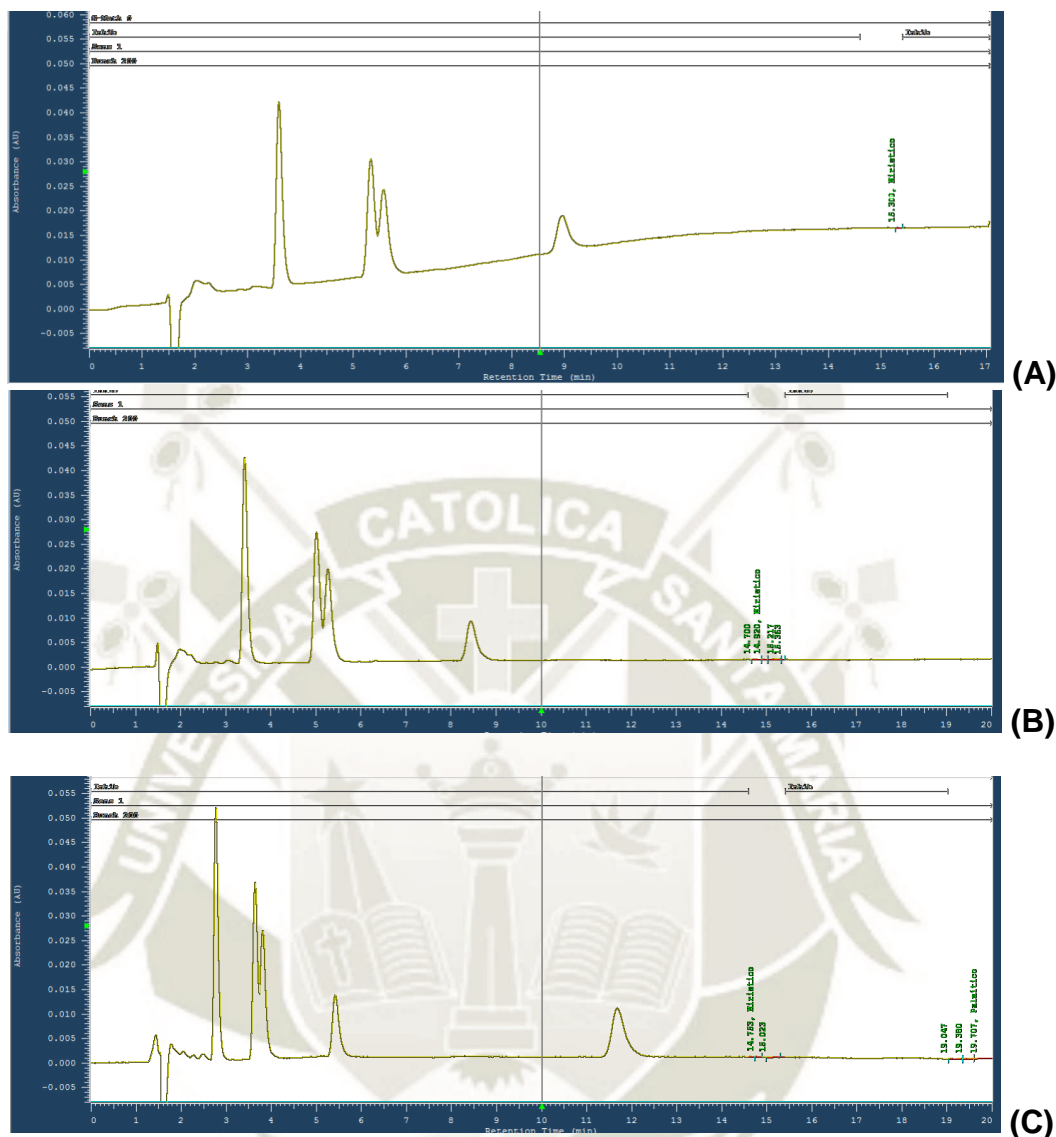
Ilustración 18. Cromatograma de los estándares eluidos con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : MeOH (65:35)

Posteriormente, se ensayó con las fases isocráticas descritas en la Tabla 10 a flujo de 1 mL/min, con la esperanza de que al aumentar agua se puedan separar a los analitos, la detección fue a 210 nm debido a que a 280 nm no se detectaron picos.

Tabla 10. Ensayos con diferentes Fases móviles isocráticas

	Fase Móvil		
	ACN AcOH. 0.1%	MeOH	H ₂ O
A	70%	20%	10%
B	80%	10%	10%
C	90%	5%	5%

Al comparar los resultados obtenidos de estas 3 corridas, se observó que a mayor proporción de MeOH, las macamidas demoraban más en eluir, en el cromatograma (A) de la Figura 17 se observa que la macamida (1) tiene un RT a los 3.75 min, a diferencia de los cromatogramas (B) y (C) donde la misma macamida aparece a los 3.55 y 2.88 min respectivamente, por otro lado los picos se tornaban más finos cuando la cantidad de MeOH disminuía y finalmente recalcar que solo con la última fase móvil (C) se pudieron obtener los 5 picos correspondientes a los 5 estándares con un tiempo de corrida de 13 min, lo cual es una ventaja debido a que no necesita gradiente ni tampoco que todos los solventes estén acidificados. En los tres ensayos desarrollados se evidencia que las macamidas (3) y (2) no se separan, situación que descarta las condiciones hasta ahora probadas.



*Ilustración 19. Cromatogramas obtenidos con la diferentes proporciones de ACN-AcOH
0.1% : MeOH : H₂O*

Con el objetivo de separar a las macámidas (3) y (2) así como provocar que la elución de los analitos sea en un tiempo mayor a los 4 min. de iniciada la corrida es que se decidió aumentar la longitud de la Fase estacionaria, para ello se conectaron 2 columnas Chromolith al sistema.

La prueba se inició con la última Fase móvil probada, la mezcla isocrática estaba compuesta por ACN-AcOH 0.1% : MeOH : H₂O (90:5:5) a un flujo a 1 mL/min, obteniéndose un aumento considerable en el tiempo de retención de la primera

macamida eluída, cerca de 6 min, además de una mejor separación de los estándares (3) y (2) como se puede observar en la Figura 20.

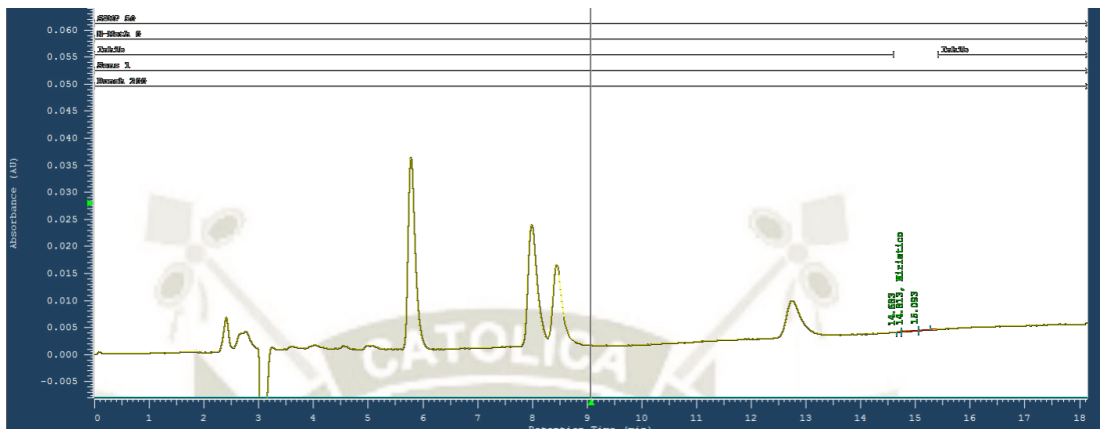


Ilustración 20. Cromatograma obtenido con una Fase móvil compuesta por ACN-AcOH 0.1% : MeOH : H₂O a través de 2 columnas Chromolith

Frente a este resultado, se realizaron pequeños cambios para tratar de separar los analitos, entre ellos se intentó quitando el metanol de la fase móvil, quedando en ACN-AcOH 0.1% : H₂O (90:10) a un flujo a 1 mL/min. Como se observa en la Figura 21 estos cambios provocaron un mayor retraso en la elución de las macamidas así como un ligero incremento en el ancho de los picos y la presencia de *tailing*, efecto que podría ser explicado por la mayor longitud de la columna

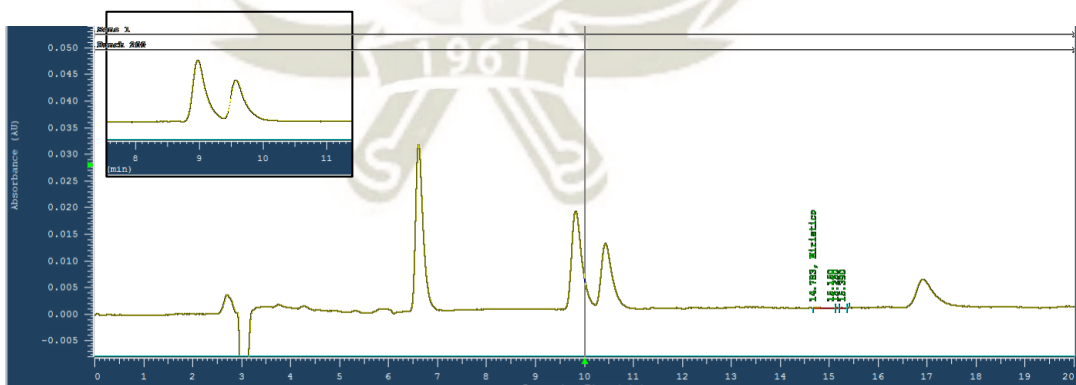


Ilustración 21. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H₂O (90:10) y con dos columnas Chromolith

Adicionalmente se observa que el tiempo de corrida supera los 20 min, por lo que se realizó una modificación más aumentando el tiempo de corrida y el flujo a 2mL/min, el cromatograma de la Figura 22, muestra una mejora visual en la forma

del pico de los 3 primeros estándares eluidos, sin embargo, cerca de los minutos 14 y 21 se intensifica la pérdida de resolución de los picos.

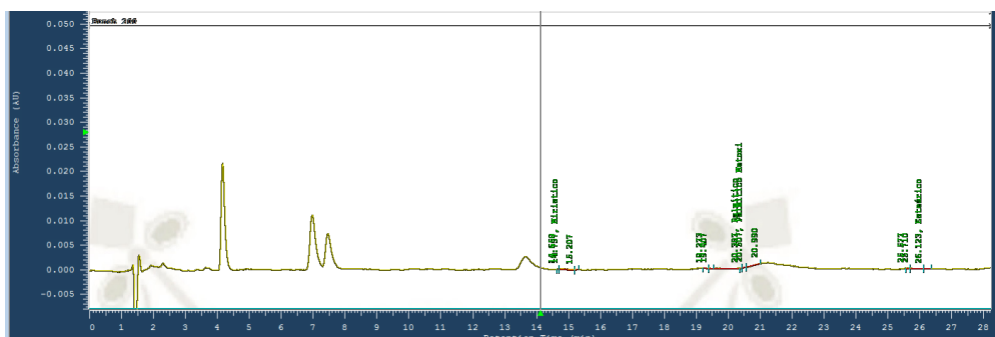


Ilustración 22. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H₂O (90:10) y con dos columnas Chromolith a flujo de 2mL/min

Dados los resultados, se cambió de columna a una Thermo Scientific, Hypersil Gold (250x4mm, 5 μ) y se realizó una corrida con la fase móvil compuesta de ACN-AcOH 0.1% : H₂O (85 : 15) a 2mL/min, condiciones en las cuales, anteriormente, se obtuvo la elución de los 5 estándares a los 3.0 , 4.6, 4.8, 7.5 y 20.9 minutos. Como se puede observar en la Figura 23, aparecen los 5 picos en un tiempo de corrida de 23 minutos, adicionalmente el primer estándar de macamida tiene un RT de 3.25 minutos, sin embargo, los picos correspondientes a los estándares (3) y (2) no están totalmente separados.

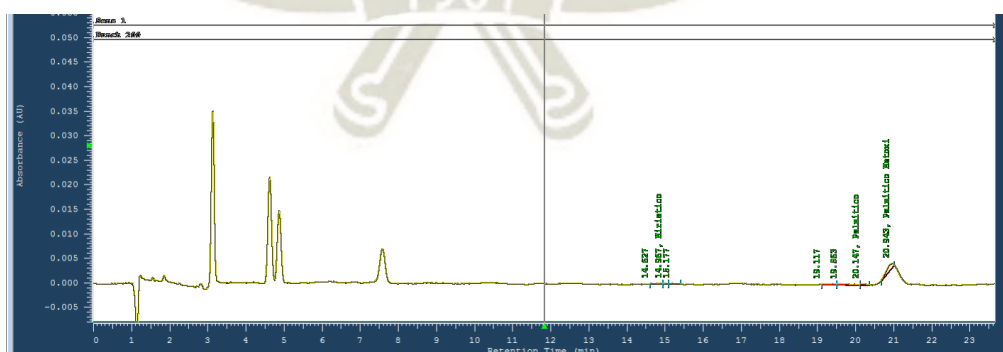


Ilustración 23. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H₂O (85:15) y con la columna Hypersil Gold

Con el fin de separar los picos anteriormente mencionados, se probó aumentando la proporción de agua en la mezcla; ACN-AcOH 0.1% (80%) y H₂O (20%) a

2mL/min. Obteniendo un cromatograma más fino, con un primer pico detectable a los 4.22 min seguido de dos picos cercanos a 6.8 min y el otro 7.25 min y un último pico a 12.30 min. Como se puede ver en la Figura 24

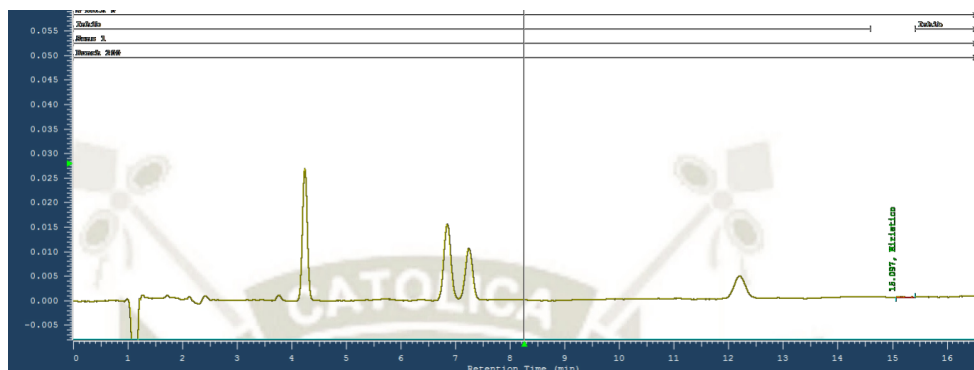


Ilustración 24. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H₂O (80:20) y con la columna Hypersil Gold

Una vez decidida la fase móvil, se inyectó un extracto diluido a 10 µg/ 5mL de acetonitrilo. Como se observa en la Figura 25. hubo una gran cantidad de picos en la zona de reconocimiento de las macámidas, los cuales en los primeros minutos perdieron resolución, así como se puede ver, la mayoría de ellos no alcanza una línea base adecuada.

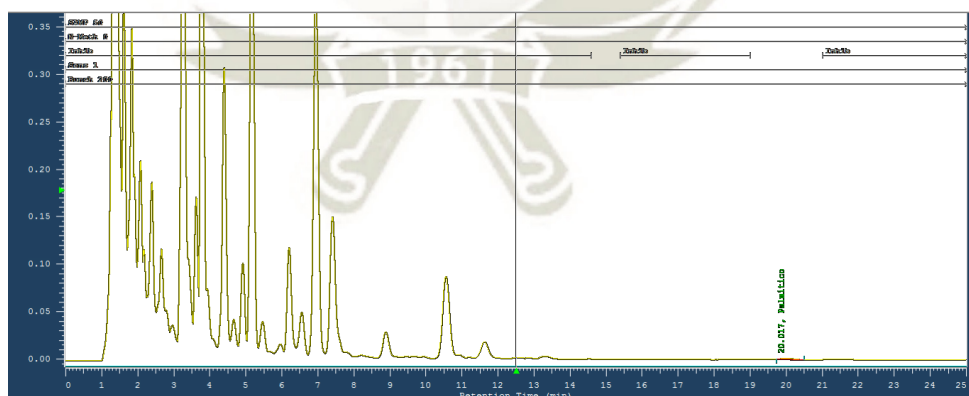


Ilustración 25. Cromatograma del extracto pentánico de maca disuelto en ACN con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H₂O (80:20) y con la columna Hypersil Gold

Teniendo en consideración que los estándares estaban disueltos en Metanol grado HPLC, se decidió cambiar el solvente de la muestra a MeOH, y preparar una dilución

de 2 mg en 5 mL de solvente. El cromatograma obtenido (Figura 24), tuvo picos con absorbancias 7 veces menores al visto anteriormente, además la cantidad de picos detectados fue menor.

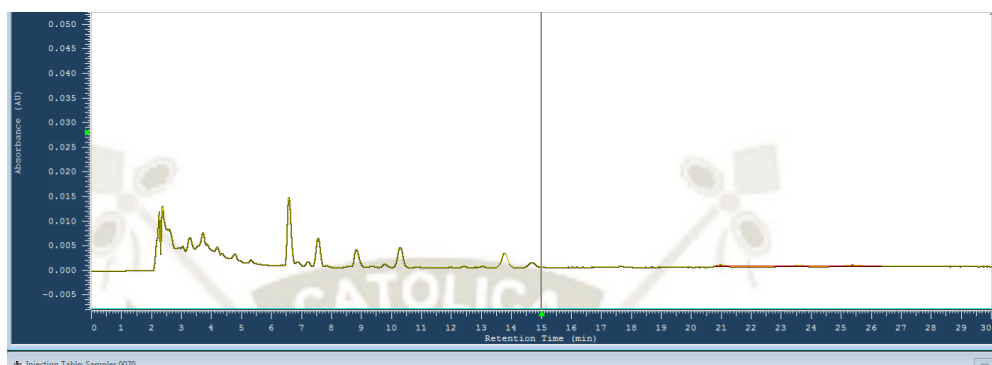


Ilustración 26. Cromatograma obtenido del extracto pentánico de maca disuelto en MeOH, con la Fase móvil ACN-AcOH 0.1% : H₂O (80:20) y con la columna Hypersil Gold

A pesar de que se logró, una adecuada separación de los componentes en el mix de estándar, no fue un resultado aceptable en nuestras muestras por lo que se decidió probar con la Fase móvil desarrollada por McCollom y colaboradores descrita en el trabajo de investigación “Analysis of macamides in samples of maca by HPLC-UV-MS/MS” donde se identificó a la N-bencil hexadecanamida, N-bencil octadecanamida, N-bencil (9Z) octadecenamida, N-bencil (9Z, 12Z) octadecadienamida así como al ácido linoleico y ácido linolénico.

Tabla 11. Fase móvil propuesta por McCollom

Tiempo	ACN –TFA. 0.005%	H ₂ O – TFA 0.005%	Flujo
0 min	80	20	0.8 mL/min
24 min	100	0	0.8 mL/min
30 min	100	0	0.8 mL/min

La fase móvil fue planteada en gradiente como se muestra en la Tabla 11, donde el acetonitrilo y el agua utilizada fueron acidificados con Ac. trifluoroacético (TFA) al 0.005%, tal como lo trabajó también Ganzera y colaboradores.

Cabe mencionar que la temperatura de nuestra columna permanecía a 30°C, como se observa en la Figura 26. pese al menor flujo utilizado, la corrida termina a los 30 minutos, el primer estándar eluye a los 9,7min, los estándares se muestran con picos finos, una buena línea base, y bien separados.

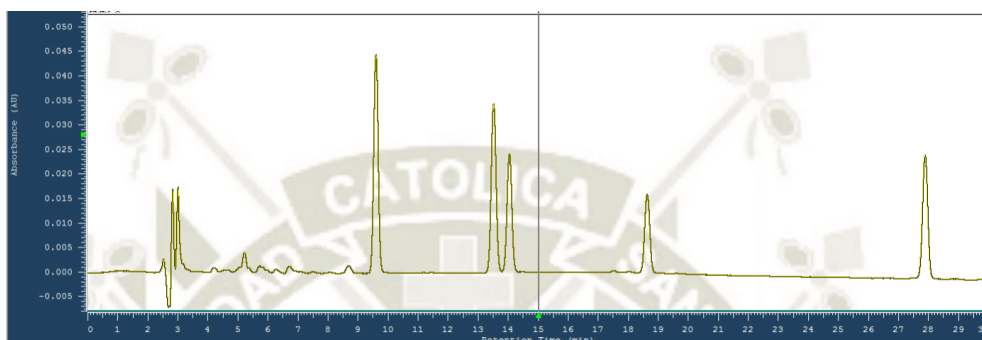


Ilustración 27. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-TFA 0.005% : H₂O- TFA 0.005% y con la columna Hypersil Gold

Con dichas condiciones se inyectó 20 µL del extracto pentánico de maca diluido (5 mg en 5 mL de metanol), obteniendo el cromatograma de la Figura 28, que mostró una gran cantidad de picos sin buena resolución y en una buena concentración que eluían durante los 15 primeros minutos, lo cual afectaba la detección e identificación de 3 de las macamidas analizadas.

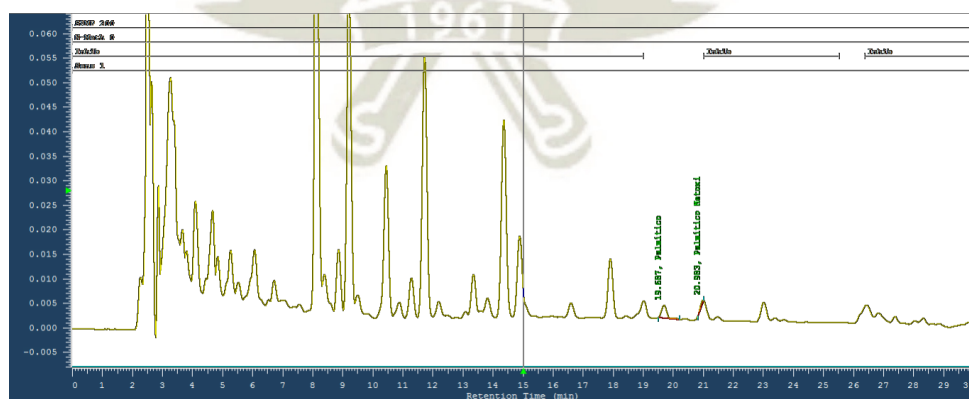


Ilustración 28. Cromatograma del extracto de maca diluido en MeOH con la Fase móvil ACN-TFA 0.005% : H₂O- TFA 0.005% y con la columna Hypersil Gold

Siguiendo la metodología desarrollada por McGollon, se cambió la temperatura a 40°C con lo que los componentes eluían 2 minutos más rápido que en la prueba anterior, pero sin mejoras en cuanto a la resolución de los picos.

Con estos resultados, se decidió disminuir el flujo de la corrida a 0.5 mL/min y mantener la temperatura de la corrida cromatográfica en 30°C, obteniendo el cromatograma mostrado en la Figura 29.

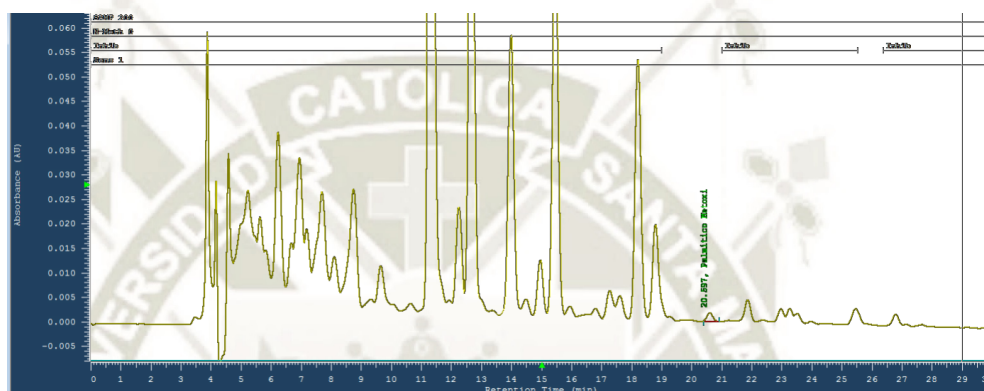


Ilustración 29. Cromatograma obtenido con la Fase móvil ACN-TFA 0.005% : H₂O- TFA 0.005% y con la columna Hypersil Gold y flujo de 0.5mL/min

Siendo esta última, las condiciones elegidas para la cuantificación e identificación de macamidas en los extractos obtenidos, así la fase móvil quedó como se muestra en la Tabla 12. Adicionalmente mencionar que se aumentó el tiempo de recorrida para asegurarnos que todo el contenido de las muestras sea expulsado de la columna antes de la siguiente inyección.

Se obtuvieron los picos de identificación de las 5 macamidas en un tiempo de corrida de 40 minutos, a una longitud de onda de 210 nm, usando una columna Thermo Scientific, Hypersil Gold (250 x4 mm, 5 μ), una fase móvil compuesta por Acetonitrilo acidificado a 0.005% (A) y agua acidificada a 0.005% (B) con TFA, usando una gradiente 80:20 (A:B) de 0 a 24 minutos, luego de 100:0 (A:B) de 24 a 32 minutos y de 80:20 (A:B) de 32 a 40 minutos, a un flujo de 0.5 mL/min. Las macamidas fueron identificadas en los siguientes tiempos de retención: **(1)** (14,9 min), **(2)** (19,9 min), **(3)** (20,6 min), **(5)** (25,9 min), **(11)** (36,6min), como se muestra en la Figura 30

Tabla 12. Fase móvil final

Tiempo	ACN – TFA 0.005%	H ₂ O – TFA 0.005%	Flujo
0 min	80	20	0.5 mL/min
24 min	100	0	0.5 mL/min
32 min	100	0	0.5 mL/min
34 min	80	20	0.5 mL/min
40 min	80	20	0.5 mL/min
41 min	80	20	2.0 mL/min
45 min	80	20	2.0 mL/min

Por último, se decidió acidificar solamente el H₂O con TFA a 0.005%, de acuerdo al trabajo reportado por Shu-Xiao Chen quien tenía como fase móvil ACN : H₂O⁴⁶, de esta manera manteníamos un pH próximo a 2.3. El tiempo de retención para las macamidias estudiadas, con este cambio en la fase móvil, se retardó en casi 0.3 min para los primeros 4 estándares en eluir; **(1)** (15.13 min), **(2)** (20.17 min), **(3)** (20.83 min), **(5)** (26.15 min), **(11)** (36.62 min)

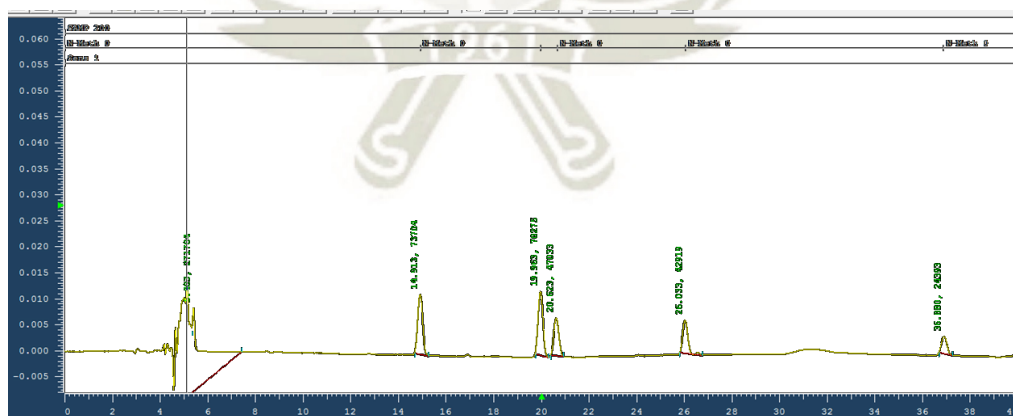


Ilustración 30. Análisis de las cinco macamidias con las últimas condiciones cromatográficas

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS POR HPLC

Una vez elegidas las condiciones cromatográficas, se midieron 4 parámetros idóneos según la AOAC para el proceso de validación de método analítico, con esta finalidad y para poder determinar la concentración de las macamidas estudiadas en los extractos obtenidos, se preparó una curva de calibración, hallando linealidad, los límites de detección y cuantificación, así como la precisión y exactitud.

a) Linealidad

Dicho parámetro adquiere importancia dentro de una validación ya que describe la relación de concentración en función de la respuesta, generando resultados directamente proporcionales a la concentración del analito, dentro de un rango determinado.⁶⁶ Para evaluar la linealidad del método cromatográfico propuesto, se construyó gráficas de concentración – respuesta. Ambas variables fueron analizadas mediante el tratamiento matemático, representado por una recta de regresión de tipo lineal

$$y = a + bx$$

Como se mencionó en el acápite anterior se prepararon las soluciones stock de cada una de las macamidas a evaluar a 200 µg/mL, a partir de estas se sacaron las alícuotas correspondientes para la obtención de 6 patrones. Inicialmente se prepararon y corrieron una serie de estándares en un rango 0.25 a 4.00 µg/mL, obteniendo un coeficiente de correlación (R^2) mayor a 0.999 a excepción de la *N*-(3-metoxibencil) hexadecanamida, como se muestra en la Tabla 13. y en el Anexo 1.

Sin embargo, como la curva de calibración es el conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se deberá cuantificar el compuesto por analizar, al momento de comparar las macamidas encontradas en las muestras (las cuales para asegurarnos de identificar la mayor cantidad de macamidas se

pesó alrededor de 30mg de extracto) nos percatamos que 2 de ellas superaban grandemente el rango de la curva obtenida, por lo que se trabajó con un rango de 0.25 a 50.00 µg/mL en metanol. En la Figura 31 se plasma la preparación de la mezcla utilizada para cada uno de los estándares

Tabla 13. Evaluación de la linealidad en un rango de 0.5 a 4 µg/mL

Código de identificación	Estándares				
	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Tiempo de retención (min)	14.9	19.9	20.6	25.99	36.9
Concentración de estándar (ppm)	Promedio de áreas				
0.25	4994.00	7733.67	4408.33	12717.00	3879.67
0.5	12227.33	13955.67	9770.33	22747.67	8945.67
1	25962.00	27451.33	20855.33	45722.33	19317.00
2	57077.33	56841.67	43625.67	87128.33	42111.00
3	87154.00	85348.00	69016.33	129294.00	66594.67
4	120972.67	118943.33	92405.67	176634.67	89110.67
R^2	0.9993	0.9987	0.9996	0.9995	0.9996
b	30791	29493	23581	43364	22910
a	-3769.2	-1128.9	-2235.7	1346.3	-2720

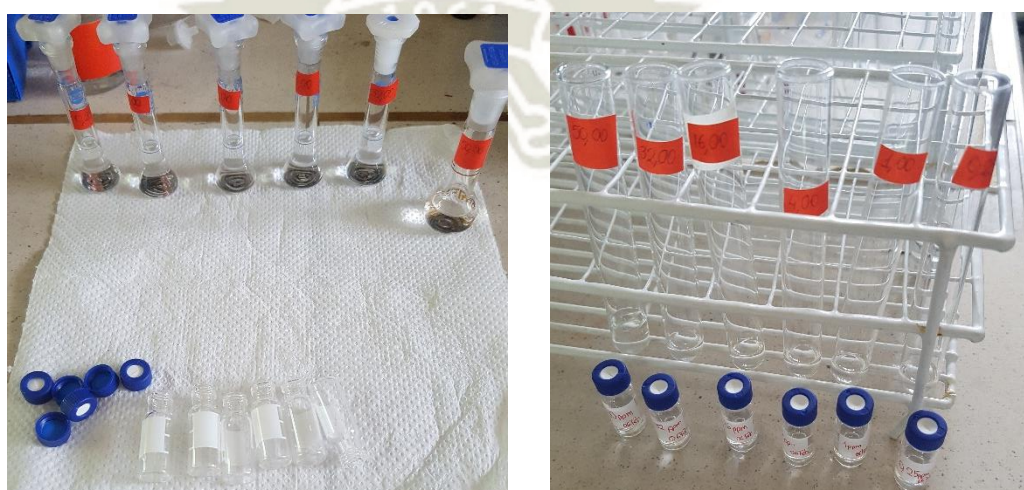


Ilustración 31. Preparación de la curva de calibración

Se realizaron 4 repeticiones, de las cuales se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada una de las macamidas dichos datos se observan en el Anexo 2. En la Tabla 14, se ha extraído la ecuación lineal de cada curva de calibración, la cual sirvió para el cálculo de las macamidas presentes en cada extracto. Como se puede observar, el método muestra un comportamiento lineal, donde la respuesta obtenida (área del pico) tiene una relación directamente proporcional a la concentración del analito, para ello se calculó el coeficiente de correlación siendo los resultados para cada macamida, como sigue; **(1)** = 0.99915, **(3)** = 0.99853, **(2)** = 0.99902, **(5)** = 0.99927, **(11)** = 0.99815, todos ellos se aproximan a 1.

Sin embargo, fue necesario evaluar el coeficiente de determinación (R^2) el cual fue mayor a 0.99 en todos los casos. Para una mayor aproximación, se realizó un test estadístico, en el cual se calcula un valor t regresión con n-2 grados de libertad y se compara con un t tabulado para un nivel de confianza de 95%

Finalmente se puede mencionar que pese a aumentar la concentración de los estándares hasta 200 veces más, el método es lineal pese a que el valor de R^2 haya disminuido en un decimal.

Cabe mencionar que en el trabajo de McCollom, se obtuvo una buena respuesta lineal (ecuación lineal: $y = 1971x + 0.064$; $R^2 = 0.9999$) con un rango de 0.28 - 1.76 μg de la N-bencil hexadecanamida, en el mencionado trabajo se utilizó una fase estacionaria C-18 (columna Zorbax XDB) con una fase móvil ácida, similar al planteado en esta investigación a diferencia de la temperatura de la columna a 40°C, consiguió la identificación de 4 macamidas con un tiempo de ejecución de 30 minutos.³¹

Por otro lado, Ganzera et al. obtuvieron una buena separación de 5 macamidas en 35 minutos usando una fase estacionaria C-12, una fase móvil (acetoniitrilo : agua) acidificada con TFA en gradiente 55:45 a 95:5 a un flujo de 1mL/min, y a una temperatura de la columna a 40 °C. La respuesta del detector fue lineal con

coeficientes de correlación mayores a 0.999 para todos los compuestos cuantificados, en un rango de concentración de 2.1 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para un macaeno, la N-bencil hexadecanamida y un N-bencil-oxo-octadecadienamida, y de 6.2 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ para los ácidos linoleico y linolénico.³¹

Adicionalmente, Shu-Xiao Chen et al, desarrolló un método para evaluar 12 compuestos presentes en la maca, entre macamidas y macaenos, la separación cromatográfica deseable la obtuvo en una columna Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 μm) conectada con un cartucho Phenomenex Security Guard ULTRA (UHPLC C18, 2.1 mm) usando como fase móvil A (solución acuosa de ácido fórmico al 0,1%) y acetonitrilo en un programa de elución en gradiente: 0 - 20 min, de 40% a 15% de A, con flujo de 0,5 mL/min. La longitud de onda se ajustó a 210 nm y a temperatura de 40 °C. Los datos de espectrometría de masas de alta precisión se registraron en un espectrómetro de masas Agilent QTOF 6550 (Agilent, Waldbronn) menciona que las curvas de calibración obtenidas mostraron una buena regresión lineal ($R^2 > 0.9990$), pero no especifica los rangos de prueba con los que trabajó.⁴⁶

Tabla 14. Evaluación de la linealidad en un rango de 0.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$

Código de identificación	Estándares				
	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Tiempo de retención (min)	15.06	20.10	20.77	26.08	36.48
Concentración de estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Área				
0.25	4816.83	4972.00	5051.60	6000.00	2791.00
1.0	26276.66	29282.80	22626.50	25679	14361.33
4.0	109023.50	103359.83	86908.6667	94213.5714	54866.50
16.0	476961.83	469795.66	383466	386346.714	259961.83
32.0	969922.83	959283.33	760614.62	801517.37	522691.50
50.0	1419222.40	1375194.20	1111394.40	1176049.50	744018.50
<i>R</i> ²	0.9983	0.9971	0.9981	0.9986	0.9963
<i>b</i>	3931.33	6573.10	6334.26	4489.38	4016.60
<i>a</i>	28887.51	28110.88	22586.50	23853.46	15250.27

(b) Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LDD) es un parámetro, que se define como la cantidad o concentración mínima del analito que puede ser detectada bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, a partir del LDD nos aseguramos que la concentración de la sustancia analizada está por encima o por debajo de un nivel de seguridad.⁶⁶

Mientras que el Límite de cuantificación (LOQ) expresa la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones establecidas en el procedimiento analítico.⁶⁶

Con los datos obtenidos anteriormente en el gráfico de calibración, se halló los límites de detección y de cuantificación teniendo en consideración un ratio de señal:ruido de 3:1 para el Límite de Detección y uno de 10:1 para el de Cuantificación. El cálculo se realizó sustituyendo los valores en las siguientes fórmulas:

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \qquad LOQ = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Y_{bl} : intercepto del gráfico de calibración

S_{bl} : intercepto del gráfico de calibración vs desviación estándar

b : pendiente del gráfico de calibración

n : número de muestras o repeticiones

Tabla 15. Límite de detección y Límite de cuantificación

	Estándares				
Código de Identificación	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Límite de Detección µg/mL	0.10	0.17	0.27	0.13	0.10
Límite de Cuantificación µg/mL	0.20	0.32	0.59	0.64	0.11

Como se muestra en la Tabla 15 las macamidas que tuvieron un menor límite de detección ($0.1\mu\text{g/mL}$) fueron la N-(3-metoxibencil) tetradecanamida y N-bencil tetracosanamida, aquellas que tienen el tiempo de retención a los extremos de la corrida a diferencia de la N-bencil hexadecanamida que tiene un valor mayor en más de 2 veces, la cual llama la atención, ya que tiene un límite de detección mayor incluso al primer estándar medido. Por otro lado, el límite de cuantificación de las macamidas (3), (2) y (5) es superior al primer estándar medido.

Sin embargo, los valores obtenidos son aproximadamente 10 veces más altos que los obtenidos por McCollom et al, ya que reportan que la cantidad de *N-benzyl hexadecanamida* a la que se observó un cambio obvio en el factor de respuesta fue de 15ng (LOQ), así mismo su límite de detección se estableció con una cantidad de 2,8 ng de *N-benzyl hexadecanamida*.³¹

En el trabajo de Ganzera y colaboradores, no mencionan al límite de cuantificación y se encontró un límite de detección de $0.40\mu\text{g/mL}$ o inferior para las dos macamidas analizadas; considerando este dato, podemos decir que el LDD reportado, es mayor a los encontrados en el presente trabajo.

Finalmente, en el trabajo de Shu-Xiao Chen et al, reportaron que los LOD y los LOQ para los doce compuestos investigados, fueron inferiores a 20.21 y 59.73 ng, respectivamente.⁴⁶

(c) Precisión

Como está definido en la Farmacopea Europea, la precisión de un procedimiento analítico indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestras múltiples de la misma muestra homogénea, sin considerar la proximidad al valor real. La precisión puede considerarse en 2 niveles: repetibilidad y precisión intermedia.⁶⁶

Repetibilidad

Se evaluó mediante la inyección de 6 muestras estándar homogéneas, que se encontraban en la concentración de 4 μ g/mL dichas mediciones se realizaron en condiciones operativas similares, en un mismo día, en un mismo equipo, mismo analista, los resultados se muestran en la Tabla 16. De todos los valores obtenidos, las macamidas (5) y (11) son las que presentan un Coeficiente de variación porcentual más alto cercano a 4.00%. Sin embargo, como no fue la mayor concentración se realizaron 3 repeticiones de las concentraciones de 0.25, 4.0 y 50.0 ug/mL lo cual se muestra en la Tabla 17

Tabla 16. evaluación de la repetibilidad del método

N°	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
1	119697	122342	92334	176369	87313
2	120346	126198	93380	177155	84165
3	129481	130586	93240	195506	94293
4	119940	131124	92635	181304	92236
5	121953	123718	92756	178873	89814
6	120659	125801	93936	176981	88538
<i>PROM</i>	<i>122012.6</i>	<i>126628.1</i>	<i>93046.8</i>	<i>181031.3</i>	<i>89393.1</i>
<i>DS</i>	<i>3742.9</i>	<i>3566.15</i>	<i>583.3</i>	<i>7313.2</i>	<i>3596.0</i>
<i>CV</i>	<i>3.07</i>	<i>2.82</i>	<i>0.63</i>	<i>4.04</i>	<i>4.02</i>

Para el análisis de la variabilidad de las respuestas obtenidas se utilizó el coeficiente de variación (CV) fue calculado a partir de la desviación estándar y el promedio de las lecturas obtenidas y cuyo criterio de aceptación es no mayor al 5%. Como se observa, se obtuvieron valores máximos de 4.097% para la concentración más baja trabajada para el estándar (11) y (1); mientras que el resto está por debajo de 2%.

Tabla 17. evaluación de la precisión del método

	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Estándar a 0.25 ug/mL					
	4834	5835	4833	36959	3075
	5229	5757	4811	36287	3284
	4960	5818	4667	36704	3050
<i>Prom</i>	<i>5007.6667</i>	<i>5803.3333</i>	<i>4770.3333</i>	<i>36650</i>	<i>3136.3333</i>
<i>DS</i>	<i>201.7680</i>	<i>41.0162</i>	<i>90.1628</i>	<i>339.2388</i>	<i>128.4925</i>
<i>CV</i>	<i>4.029</i>	<i>0.707</i>	<i>1.890</i>	<i>0.926</i>	<i>4.097</i>
Estándar a 4.0 ug/mL					
	120869	125149	92467	178204	89526
	119899	124711	93121	177162	86974
	120323	125925	93388	178517	88733
<i>Prom</i>	<i>120363.667</i>	<i>125261.667</i>	<i>92992.00</i>	<i>177961.00</i>	<i>88411.00</i>
<i>DS</i>	<i>486.28</i>	<i>614.79</i>	<i>473.86</i>	<i>709.43</i>	<i>1306.12</i>
<i>CV</i>	<i>0.404</i>	<i>0.491</i>	<i>0.510</i>	<i>0.399</i>	<i>1.477</i>
Estándar a 50.0 ug/mL					
	1464605	1626872	1129086	2140156	1110772
	1456941	1634997	1130288	2138454	1119830
	1509030	1617230	1125879	2142720	1119710
<i>Prom</i>	<i>1476858.67</i>	<i>1626366.33</i>	<i>1128417.67</i>	<i>2140443.33</i>	<i>1116770.67</i>
<i>DS</i>	<i>28123.482</i>	<i>8894.2873</i>	<i>2279.2153</i>	<i>2147.4658</i>	<i>5195.3442</i>
<i>CV</i>	<i>1.904</i>	<i>0.547</i>	<i>0.202</i>	<i>0.100</i>	<i>0.465</i>

Precisión intermedia

Para ello, se tuvo en cuenta las condiciones reproducibles donde se evaluó factores como día de ensayo y preparación de fase móvil. Se determinó el coeficiente de variación a partir de los promedios y desviaciones estándar de las lecturas obtenidas de las curvas de calibración para cada macamida. Obteniendo valores entre 0.09% hasta 9.59%. dichos resultados se muestran en el Anexo 2.

Teniendo en consideración, dicho parámetro, McCollom halló una repetibilidad de 0.043% y una precisión intermedia de 0.044% con la N-bencil hexadecanamida y para el total de macamidas los valores fueron de 0.18% y 0.183% respectivamente.³¹

Mientras que Ganzera, menciona que todas las muestras se inyectaron por triplicado, y las desviaciones estándar resultantes tuvieron un máximo de 2.15% lo cual afirma la precisión del método. También evaluó la precisión intermedia del ensayo en 3 días consecutivos con 5 repeticiones cada uno. Todos los resultados fueron consistentes con desviaciones estándar relativas inferiores al 1,7%.³³

En el trabajo de Shu-Xiao Chen, las variaciones intra e interdía totales estuvieron dentro de 0.68-2.66% y 0.66-2.50% para los doce analitos. Los estudios de validación de este método mostraron una buena repetibilidad con una DSR menor del 3.0% (n = 3) para los analitos investigados⁴⁶

(d) Exactitud

Una de las características que debe cumplir un método validado es ser exacto; parámetro que expresa la cercanía entre el valor que se acepta como verdadero o de referencia y el valor encontrado⁶⁶. Para ello, a 16.96 mg del extracto de maca negra que fue pesada en una fiola de 2 mL se le agregó el volumen necesario para fortalecer la muestra con una concentración de 1 μ g/mL de cada estándar antes de ser enrasada luego se procedió a filtrar para ser inyectada en el equipo.

Como se puede observar en la Tabla 18, el porcentaje de recuperación obtenido para cada macamida analizada tiene un rango de 80.91 a 101.26 %, criterios aceptados para métodos cromatográficos, así mismo remarcar que son valores parecidos a los obtenidos en las investigaciones que se detallan a continuación.

Tabla 18. evaluación de la exactitud del método

	(3)		(2)		(5)		(11)	
	muestra	M + Std	muestra	M + Std	muestra	M + Std	muestra	M + Std
	0.3298	1.1362	72.4243	73.5619	4.4378	5.5838	1.528	2.442
	0.3377	1.1453	72.4227	73.7006	4.6104	5.5941	1.2161	2.4447
	0.3179	1.1311	72.9112	73.4227	4.4738	5.3448	1.2259	2.121
Promedio	0.3285	1.1375	72.5861	73.5617	4.5073	5.5076	1.3233	2.3359
DS	0.0100	0.0072	0.2816	0.1390	0.0911	0.1411	0.1773	0.1861
Recup. %		80.91		97.57		100.02		101.26

McCollom reporta el porcentaje de recuperación obtenido con el estándar de N-bencilhexadecanamida de $100.2\% \pm 4.7$, valores cercanos a los obtenidos con nuestras 4 macamidas analizadas.

Las tasas de recuperación resultantes en el trabajo de Ganzera *et al.*, estuvieron entre 97.11 - 102.56%; estos datos los relacionan con la integridad del tratamiento de la muestra, enfocado en el procedimiento de extracción, así como la filtración de muestra³³.

Shu-Xiao Chen concluye que el método analítico desarrollado durante su trabajo de investigación, fue lo suficientemente preciso, sensible para la evaluación cuantitativa simultánea de las doce macamidas y macaenos principales en hipocótilos de Maca, presentando una recuperación global de 96.50 a 101.80% (n = 3) para los analitos.⁴⁶

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS EN LOS EXTRACTOS PENTÁNICOS

Una vez obtenidos los extractos y elegidos los parámetros cromatográficos, se procedió a la identificación y cuantificación de las macamidas presentes en cada variedad de maca.

Para ello se probó en un inicio con 5mg de extracto disueltos en 5mL de metanol, donde después de compararlo con los estándares solo se identificaba a la Hexadecanamida y a la Octadecanamida. Por ello, es que se decide aumentar la cantidad de extracto a un peso alrededor del 30mg en 5mL, así como el rango de la curva de calibración (como se mencionó anteriormente). En la Figura 32 se muestra la corrida del extracto pentánico de maca roja.

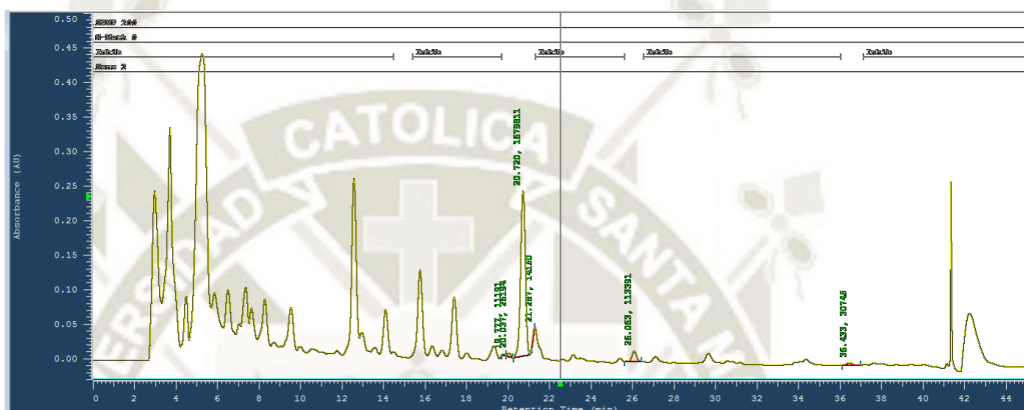


Ilustración 32. Cromatograma del análisis del extracto de maca roja

Con la idea de eliminar los componentes no deseados, que eluyen entre los primeros 10 minutos como se observa en la Figura 32, se hizo un tratamiento previo en un cartucho de sílica (extracción fase sólida) y metanol. Estos cartuchos fueron preparados en el laboratorio, para ello, el contenedor de plástico así como la membrana fueron reciclados de trabajos anteriores y sonicados con Metanol por 5 min por 4 veces, posteriormente, dejados a secar durante una noche; mientras que la sílica (SiO_2) fue activada a 60°C por 2 horas y dejada en el desecador. Para armar el cartucho, se coloca primero la membrana y se agrega 1.0g de SiO_2 y se empaca con ayuda de vacío. Una vez listo se procede a activar la fase estacionaria de la columna con 2mL de MeOH, luego se coloca la muestra (2mL de extracto de maca 21mg/5mL) y con ayuda de vacío se deja eluir el contenido y se va recolectando la solución, por último, se agregó 2mL más de MeOH para extraer la mayoría de compuestos. (Figura 33)

El contenido recolectado fue evaporado, para luego ser reconstituido a 2mL y analizado por HPLC. Tal como se muestra en el cromatograma (Figura 34) no

hubo diferencia entre la muestra preparada directamente (línea amarilla), frente a la pasada por cartucho de fase sólida (línea roja)

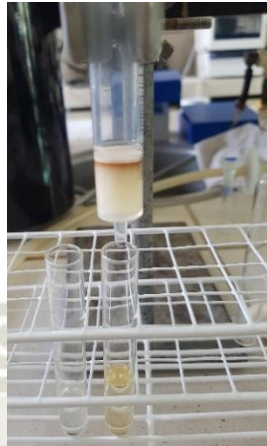


Ilustración 33. Pre-tratamiento de los extractos

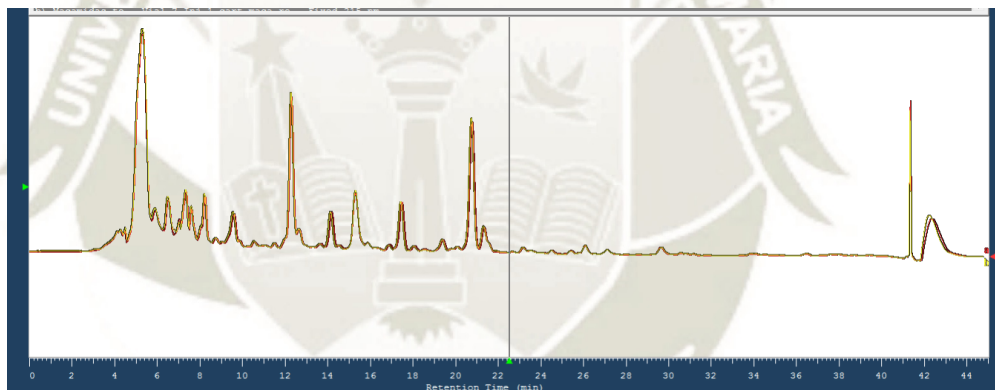


Ilustración 34. Cromatograma del extracto de maca roja pre-tratado

Motivo por el cual se continuó con la preparación de los 3 extractos de forma directa, como se muestra en la Figura 35, por triplicado y su consecuente determinación por HPLC



Ilustración 35. Extractos pentánicos diluidos en metanol

La Tabla 19 muestra las concentraciones encontradas en los extractos pentánicos obtenidos de cada macamida en las tres variedades de maca; donde se evidenció que en ninguna de las 3 variedades se encontró a la *n-benciltetradecanamida* (1) mientras que hay una mayor presencia de la *n-bencilhexadecanamida* (2), lo que se puede relacionar con el uso de ácidos grasos sintetizados en la propia planta a partir de la Acido graso Sinteasa, complejo multienzimático que tiene como producto final al ácido palmítico y a partir del mismo se pueden obtener ácidos grasos de mayor tamaño o modificados con insaturaciones o metoxilados.

Cabe mencionar que de la *n-bencilhexadecanamida* se ha encontrado mas de 5mg por gramo de extracto, en cada una de las variedades. Proporciones que también se han mostrado en otros trabajos de investigación.³¹

Sin embargo, al comparar las cantidades entre las variedades analizadas, se puede observar que la Maca Amarilla posee mayor cantidad de *n-bencilhexadecanamida* ($58.14 \pm 1.8\text{mg/g}$) en comparación de las otras 2 variedades que no sobrepasan los 20mg/g de extracto.

En cuanto a la *n-3metoxibencilhexadecanamida* (3) de la misma manera está en mayor proporción en la Maca Amarilla, seguida por la Maca Roja, sin embargo, la diferencia entre ambas cantidades encontradas no sobrepasa el doble de la proporción.

También se pudo identificar y cuantificar la presencia de la *n-bencilioctadecanamida* (5) siendo mayor en la maca amarilla que en las otras dos variedades, con una concentración de $2.98 \pm 0.0055 \text{ mg/g}$ de extracto, mientras que en la maca negra se encontró $0.5338 \pm 0.0184 \text{ mg/g}$. Sería la segunda macamida importante presente en nuestros extractos.

La (11), fue encontrada en las 3 variedades analizadas, y el patrón fue el mismo que en el análisis anterior, donde se encontró mayor cantidad en la Maca amarilla, seguida por la Maca roja y finalmente por la Maca negra; siendo la

concentración máxima de $1,3737 \pm 0.0107$ y la mínima de 0.1545 ± 0.0317 mg/g de extracto

Tabla 19. Evaluación de la concentración de macamidas en los extractos pentánicos

mg de macamida / g del extracto de Maca Roja					
	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Promedio	-	0.1265	17.3723	0.9247	0.4521
DS	-	0.0016	0.4594	0.0122	0.0021
mg de macamida / g del extracto de Maca Negra					
	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Promedio	-	0.0449	8.2749	0.5338	0.1545
DS	-	0.0052	0.1900	0.0184	0.0317
mg de macamida / g del extracto de Maca Amarilla					
	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Promedio	-	0.2687	58.1362	2.9287	1.3737
DS	-	0.0250	1.7951	0.0055	0.0107

Como ya habíamos mencionado, McCollom concluyó que, en todos los extractos, la *n-bencilhexadecanamida*, fue la macamida predominante, sin embargo, al comparar las diferentes muestras de harina obtenidos de diferentes proveedores, encontró que hubo una diferencia en el patrón de macamida. Por ejemplo, el material del proveedor 2 presentaba una cantidad mucho mayor de *n-bencilheptadecanamida*, pero casi nada de *n-benciloctadecanamida*, mientras que todos los demás materiales vegetales contenían *n-benciloctadecanamida* en cantidades mucho mayores que de *n-bencilheptadecanamida*³¹

Ganzera, en su estudio analizó nueve productos comerciales de Maca expandidas en los supermercados de Mississippi and California, donde la macamida dominante fue la *n-bencil hexadecanamida* (0,05 a 0,46%); la *n-metoxibencil octadecadienamida* solo estuvo presente en cantidades menores (0.01 a 0.06%).

Finalmente, se puede mencionar que pese a los resultados encontrados respecto a la menor cantidad de macamidas presentes en el extracto de maca negra, este, presenta un mejor efecto neuroprotector sobre células de neuroblastoma⁶⁸, según el trabajo realizado por Vera L. Karin (2018) lo que se podría atribuir a la compleja mezcla de otros compuestos activos, como los flavonoides los cuales son los responsables del color oscuro de dicha variedad



CONCLUSIONES

- 1) Se revisó y consolidó bibliográficamente las rutas biosintéticas que conllevan a la formación de las macamidas en el *Lepidium meyenii* (Maca).
- 2) Se obtuvieron los extractos pentánicos por re extracción del extracto metanólico total de tres variedades de *Lepidium meyenii* (Maca) con los siguientes rendimientos: 1.72, 2.01 y 1.68% para las variedades roja, amarilla y negra, respectivamente.
- 3) Se estandarizó el método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Performance para la determinación de macamidas, encontrándose que la separación fue posible usando una fase estacionaria C-18 Thermo Scientific, Hypersil Gold (250x4mm, 5 μ) con una fase móvil más adecuada fue de Acetonitrilo (A) y agua-TFA 0.005% (B), usando una gradiente 80:20 (A:B) de 0 a 24 minutos, luego de 100:0 (A:B), a un flujo de 0.5mL/min. De los parámetros evaluados se puede concluir que el método presentó una linealidad aceptable para el rango de concentración de 0.25 a 50 μ g/mL sensible con LOD

y LOQ variaron entre 0.10 y 0.64 $\mu\text{g/mL}$, lo suficientemente preciso, y con recuperación global entre 80.91% - 101.26%

- 4) Se logró identificar y cuantificar cuatro macamidas en tres variedades de *Lepidium meyenii* (Maca), en función de los estándares disponibles, siendo la *n-benzylhexadecanamide* (**2**) la más abundante, detectándose $58.14 \pm 1.8\text{mg/g}$ de extracto de maca amarilla y de las macamidas restantes se encontraron concentraciones inferiores a 3mg/g de extracto.





SUGERENCIAS

1. Determinar y comparar la presencia de macamidas en los productos comerciales expendidos en la ciudad de Arequipa
2. Comparar la cantidad de macamidas presentes en los hipocótilos frescos de cada una de las variedades analizadas
3. Plantear una metodología para sintetizar macamidas que no hayan sido analizadas en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quiroz, C. and Aliaga, R. “Maca (*Lepidium meyenii* Walp.),” in *Andean Roots and Tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon. Promoting the Conservation and Use of Underutilized Neglected Crops*, M. Hermann and J. Hellers, Eds., 21, 173–197, *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy, (1997).
2. Gonzales, G. F. “Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 193496, 10 pages, (2012).
3. Apumayta, U. P.; Lock de Ugaz, O. La Maca, importante especie vegetal peruana merece un mayor estudio. *Revista de Química*. Vol. VII. N° 2. Diciembre (1993)
4. Clement, Celine; Diaz Grados, Diego A; Avula, Bharathi; Khan, Ihklas A; Mayer, Andrea C; Ponce Aguirre, Dante D; Manrique, Ivan and Kreuzer, Michael. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of Maca (*Lepidium meyenii* Walpers). *J Sci Food Agric*. **90**: 861–869. (2010)
5. Aliaga Cárdenas, Rolando. La cadena de valor de la maca en la Meseta del Bombón: Análisis y lineamientos estratégicos para su desarrollo. Cooperación Alemana al Desarrollo – Agencia de la GIZ en el Perú. Primera edición, Lima – Perú, abril de 2011.
6. Machado Merino, Rafael. Caracterización física-química de 4 ecotipos de Maca (*Lepidium meyenii* Walp). “Procesos de liofilización, atomización y pregelatinización en el ecotipo seleccionado” Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María – Perú. (2001).
7. Aliaga Cárdenas, R. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la maca: *Lepidium meyenii* Walpers. Santa fé de Bogotá, CAB, ANCON. (1999).
8. Obregón, V. Maca planta medicinal y nutritiva del Perú. Instituto de Fitoterapia Americano. 200 pp. (1999)
9. Zamudio, F. Genética & Mejoramiento Forestal, Capítulo 4 “Importancia de la fuente de semilla en el mejoramiento genético forestal”. Universidad de Talca. (2002).
10. Odum, E.P. y Barrett W. *Fundamentos de ecología*. 5ª Edición Cengage Learning Editores, S.A. México, D.F. 183-185 (2006)

11. Longfei Chen, Jieying Li, Liuping Fan “The Nutritional Composition of Maca in Hypocotyls (*Lepidium meyenii* Walp.) Cultivated in Different Regions of China” *Journal of Food Quality*. 2017
12. Esparza, Eliana; Hadzich, Antonella; Kofer, Waltraud; Mithöfer, Axel; Cosio, Eric G. Bioactive maca (*Lepidium meyenii*) alkaloids are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry*, 116, 138-148. (2015)
13. Yllesca G.M. *Estudio químico fitoquímico comparativo de 3 ecotipos de Lepidium meyenii Walp (Maca) procedente de Carhuamayo (Junín)*. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; p. 103. (1994)
14. Gonzales, C.; Rubio, J.; Gasco, M.; Nieto, J.; Yucra, S.; Gonzales, G.F. “Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats.” *Journal of Ethnopharmacology*. 103, p. 448–454. (2006).
15. Gonzales, G.F.; Miranda, S.; Nieto, J.; Fernández, G.; Yucra, S.; Rubio, J. et al. “Red Maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats.” *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3, 1, p. 5. (2005).
16. Qiansi Chen, Meng Li, Chen Wang, Zefeng Li, Jiayang Xu, Qingxia Zheng, Pingping Liu, Huina Zhou. “Combining Targeted Metabolites Analysis and Transcriptomics to Reveal Chemical Composition Difference and Underlying Transcriptional Regulation in Maca (*Lepidium Meyenii* Walp.) Ecotypes” *Genes*, 9, 335. (2018).
17. Gonzales-Castañeda, C.; Rivera, V.; Chirinos, A.L.; Evelson, P.; Gonzales, G.F. Photoprotection against the uvb-induced oxidative stress and epidermal damage in mice using leaves of three different varieties of *Lepidium meyenii* (Maca). *Int. J. Dermatol.* 2011
18. Gonzales, C.; Cárdenas-Valencia, I.; Leiva-Revilla, J.; Anza-Ramirez, C.; Rubio, J.; Gonzales, G.F. Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. *Complement. Med. Res.* 17:137-143 (2010).
19. Chacon, Gloria. La Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su Habitat. *Revista Peruana de Biología*. Vol. 3, Núm. 2 (1990).

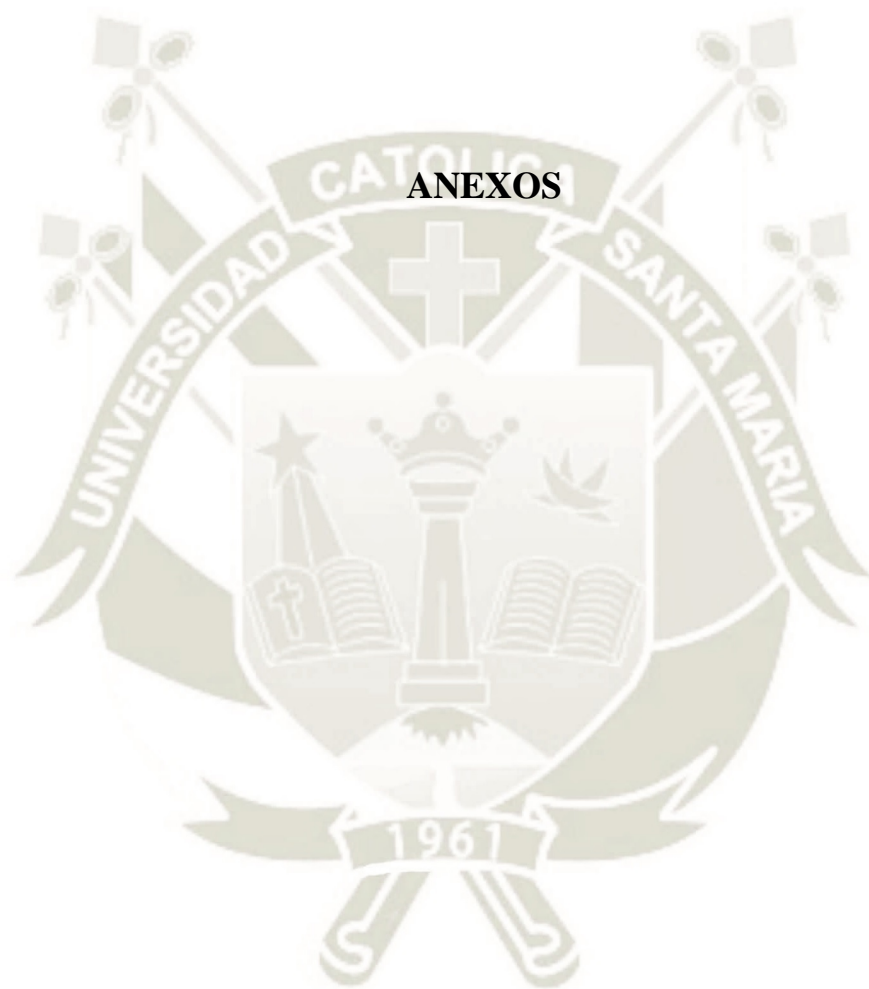
20. Manuel Sandoval, Nataly N. Okuhama, Fausto M. Angeles, Vanessa V. Melchora, Luis A. Condezob, Juan Laob, Mark J.S. Miller. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 79 207–213 (2002)
21. Sifuentes-Penagos, Gabriel; León-Vásquez, Susan; Paucar-Menacho, Luz María. Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropecuaria*. Vol.6, No. 2. abr./jun. (2015)
22. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P.; Schettino, O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49: 347–349 (1994)
23. García R.M.; Gómez-Sánchez P.I.; Espinoza B.C.; Bravo R.F.; Ganoza M.L. Tablas peruanas de composición de alimentos. Lima, Perú. (2009)
24. Wang, Y.; Mcneil, B; Harvey, L.M. “Maca: an Andean crop with multi-pharmacological functions.” *Food Res Int*. v. 40, p. 783-792. (2007)
25. Piacente, S.; Carbone, V.; Plaza, A.; Zampelli, A.; Pizza, C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.50: 5621–5625. (2002)
26. Dini, I.; Terone, G.C.; Dini, A. Glucosinolates from maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology*.30: 1087–1090 (2002)
27. Valares C. “Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente” Universidad de Extramedura – Badajoz. 2011.
28. Bryant JP, Chapin FSIII, Klein DR. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*. 40(3):357–368. (1983).
29. Ávalos G. Adolfo y Pérez-Urria C. Elena. “Metabolismo secundario de plantas” Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145. (2009)
30. Hermann, M.; Bernet, T. The Transition of Maca from Neglect to Market Prominence: Lessons for Improving Use Strategies and Market Chains of Minor Crops. *Agricultural Biodiversity and Livelihoods Discussion Papers 1*. Bioersivity International, Rome, Italy. (2009)
31. McCollom, M.M.; Villinski, J. R.; McPhail, K.L.; Craker, L.E.; Gafner, S. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochemical Analysis* 16: 463–469. (2005).

32. Zhao, J.; Muhammad, I.; Dunbar, D.C.; Mustafa, J.; Khan, I.A. New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5: 690–693. (2005).
33. Ganzera, M.; Zhao, J.; Muhammad I.; Khan, I.A. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 988–991. (2002).
34. Muhammad, I.; Zhao, J.; Dunbar, D.C.; Khan, I.A. Constituents of *Lepidium meyenii* ‘maca’. *Phytochemistry* 59: 105–110. (2002).
35. Zheng, B.L.; He, K.; Kim, C.H.; Rogers, L.; Shao, Y.; Huang, Z.Y.; Lu, Y.; Yan, S.J.; Qien L.C.; Zheng, Q.Y. “Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats.” *Urology*. 55, 4, 598–602. (2000).
36. Jones, R.B.; Faragher, J.D.; Winkler, S. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology* 41: 1–8. (2006.)
37. Li, G.; Ammermann, U.; Quirós, C.F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 55: 255–262. (2001).
38. Fahey, J.W.; Zalcmann, A.T.; Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5–51. (2001).
39. Halkier, B.A.; Gershenzon, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 303–333. (2006)
40. Yábar, E.; Pedreschi, R.; Chirinos R.; Campos, D. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry* 127: 1576–1583. (2011)
41. Boaling, C.; Bo, L.Z.; Kan, He; Qun, Y.Z. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. *Journal of Natural Products* 66: 1101–1103. (2003).
42. Lagarda, M.J.; García-Llatas, G.; Farré R. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1486–1496. (2006).

43. G. F. Gonzales, “MACA: Del alimento perdido de los Incas al milagro de los Andes: Estudio de seguridad alimentaria y nutricional” *Seguranca Alimentar e Nutricional*, Campinas, 16-17, 1, 16–36, (2010).
44. L.G.Valerio and G.F.Gonzales, “Toxicological aspects of the South American herbs cat’s claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis,” *Toxicological Reviews*, 24, 1, 11–35, (2005).
45. Flores, S.E.; Walker, T.S.; Guimarães, R.L.; Vivanco, J.M. “Raíces y tubérculos andinos.” *Hortiscience*. 38, 2, 161-167.
46. Shu-Xiao Chen, Ke-Ke Li, Duoji Pubu, Si-Ping Jiang, Bin Chen, Li-Rong Chen, Zhen Yang, Chao Ma, Xiao-Jie Gong. “Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction, HPLC and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Analysis of, Main Macamides and Macaenes from Maca (Cultivars of *Lepidium meyenii* Walp)”, *Journal Molecules*, 2017.
47. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Córdava, A; Chung, A.; Rubio, J.L. “Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m)”, *Journal of Endocrinology*. 2004, v. 180, n. 1, p.87–95.
48. Bustos-Obregón, E.; Yucra, S.; Gonzales G.F. “*Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice”, *Asian Journal of Andrology*. 7, 1, 71–76. (2005).
49. Chung, F.; Rubio, J.; Gonzales, C.; Gasco, M.; Gonzales, G.F. “Dose– response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats”. *Journal of Ethnopharmacology*. 98, 143–147. (2005).
50. Yucra. S.; Gasco, M.; Rubio, J.; Nieto, J.; Gonzales, G.F. “Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats.” *Fertil Steril*. 89, 5, 1461-7, (2008)
51. Zenico, T.; Cicero, A.F.; Valmorri, L.; Mercuriali, M.; Bercovich, E. “Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial.” *Andrologia*. 41, 2, 95-9, (2009).
52. Brooks, N.A.; Wilcox, G.; Walker, K.Z.; Ashton, J.F.; Cox, M.B.; Stojanovska, L. “Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms

- and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content”. *Menopause*. 15, 6, 1157-62. (2008).
53. Valentova, K.; Buckiova, D.; Kren, V.; Peknicova, J.; Ulrichova, J.; Simanek, V. “The in-vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts.” *Cell Biol Toxicol*. 22, 2, 91-9. (2006).
54. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Malheiros-Pereira, A.; Gonzales-Castañeda, C. “Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red Maca) on prostatic hyperplasia in adult mice”. *Andrología*. 40, 3, 179-85. (2008).
55. López-Fando, A.; Gómez-Serranillos, M.P.; Lock, I.O.; Upamayt, U.P.; Carretero, M.E. “*Lepidium peruvianum chacon* restores homeostasis impaired by restraint stress.” *Phytotherapy Research*. 18, 471–474. (2004).
56. Rubio, J.; Dang, H.; Gong, M.; Liu, X.; Chen SL, Gonzales GF. “Aqueous and hydroalcoholic extracts of black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice.” *Food Chem Toxicol*. Oct;45(10):1882-90. (2007).
57. Rubio, J.; Qiong, W.; Liu, X.; Jiang, Z.; Dang, H.; Chen, S.L.; Gonzales, G.F. “Aqueous extract of black Maca (*Lepidium meyenii*) on memory impairment induced by ovariectomy in mice.” *Evid. Based Complement. Alternat Med*. Oct 9. (2008)
58. Li, G.; Ammermann, U.; Quirós, C.F. “Glucosinolate contents in Maca (*Lepidium peruvianum Chacón*) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products” *Econ. Bot*. 55, 225–262. (2001).
59. Lee K.J.; Dabrowski, K.; Sandoval M.; Miller, M.J.S. “Activity-guided fractionation of phytochemicals of Maca meal, their anti-oxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles.” *Aquaculture*. 244, 293–301. (2005).
60. Nguyen, D.; Pino-Figueroa, J.; Maher, T.J. “In vitro evaluation of the neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) in crayfish neuronal and rat neuroblastoma cell lines” *FASEB J*. 23:947.4, (2009).
61. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-Figueroa A. The Macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol*. Oct;48(2):333-9. (2013)

62. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. “Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition.” *Bioorg Med Chem.* Sep 1; 21(17):5188-97. (2013)
63. Megan M. McCollom, Jacquelyn R. Villinski, Kerry L. McPhail, Lyle E. Craker and Stefan Gafner. “Analysis of Macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS” *Phytochem. Anal.* 16, 463–469, (2005).
64. Fernando E. Chain, Alfredo Grau, Jose C. Martins, Cesar A.N. Catalán. “Macamides from wild ‘Maca’, *Lepidium meyenii* Walpers (*Brassicaceae*)”. *Phytochemistry Letters.* 8, 145–148. (2014)
65. Libertad Alzamora, Evelyn Alvarez, Dina Torres, Hilda Solís, Erasmo Colona, Jenny Quispe y Magda Chanco. “Effect of four ecotypes of *Lepidium peruvianum* Chacón on the production of nitric oxide in vitro” *Rev. Per. Biol.* 13.3. (2007).
66. European pharmacopoeia (Ph. Eur) Liquid chromatography 2.2.29. (2016).
67. Rondón-Ortiz, A. N. Effect of *Lepidium meyenii* L. on Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 Levels. Tesis de Master, MCPHS University. (2016).
68. Karin Vera López. “Efecto neuroprotector de extracto pentánico de *Lepidium meyenii* (maca) y macamidas sintéticas frente a la neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*”. Tesis de Maestro, Universidad Católica de Santa María. (2018).
69. QUATTROCHI, Oscar Alberto, ABELAIRA DE ANDRIZZI Sara Inés y LABA Raúl Felipe, “Introducción al HPLC Aplicación y Prácticas”. Editorial Arte Gráfica Farro S.A Argentina 1992



ANEXO 1

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	(1)			<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
0.25	4904	5129	4949	4994.00	119.0588	2.38
0.5	12004	12578	12100	12227.33	307.4562	2.51
1	25713	25803	26370	25962.00	356.1924	1.37
2	57362	56816	57054	57077.33	273.7468	0.48
3	87004	87518	86940	87154.00	316.8533	0.36
4	119697	121869	121352	120972.67	1134.5996	0.94
Coef	0.9995	0.9989	0.9992	0.9993	0.0003	

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	(3)			<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
0.25	7647	7866	7688	7733.67	116.4231	1.51
0.5	14073	13758	14036	13955.67	172.1811	1.23
1	27382	26844	28128	27451.33	644.8018	2.35
2	57076	56723	56726	56841.67	202.9442	0.36
3	84328	86239	85477	85348.00	962.0088	1.13
4	120342	115149	121339	118943.33	3323.5864	2.79
Coef	0.9975	0.9996	0.9976	0.9987	0.0012	

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	(2)			<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
0.25	4362	4356	4507	4408.33	85.5005	1.94
0.5	10176	10156	8979	9770.33	685.3877	7.01
1	20797	20525	21244	20855.33	363.0321	1.74
2	44223	43442	43212	43625.67	529.9343	1.21
3	68160	68364	70525	69016.33	1310.5191	1.90
4	92334	92467	92416	92405.67	67.0994	0.07
Coef	0.9997	0.9994	0.9988	0.9993	0.0005	

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		(5)		<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>CV</i>
0.25	12999	12618	12534	12717.00	247.8044	1.95
0.5	22291	22662	23290	22747.67	504.9795	2.22
1	44783	45970	46414	45722.33	843.2344	1.84
2	85848	86461	89076	87128.33	1714.3501	1.97
3	128021	129805	130056	129294.00	1109.5706	0.86
4	176369	177155	176380	176634.67	450.6554	0.26
Coef	0.9992	0.9994	0.9997	0.9995	0.0003	

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		(11)		<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>CV</i>
0.25	3994	3771	3874	3879.67	111.6079	2.88
0.5	8967	8868	9002	8945.67	69.5006	0.78
1	19657	19525	18769	19317.00	479.1492	2.48
2	42169	41621	42543	42111.00	463.7284	1.10
3	67240	67856	64688	66594.67	1679.7016	2.52
4	87313	89526	90493	89110.67	1630.1768	1.83
Coef	0.9991	0.9989	0.9988	0.9996	0.0002	

ANEXO 2

Concentración (ppm)	(1)				<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
TR (min)	15.007	15.093	15.073	15.063	15.059	0.037	0.24
0.25	4760	5094	4815	4734	4816.833	189.394	3.93
1	26725	25879	25212	25925	26276.667	722.079	2.75
4	107469	111463	108714	108448	109023.500	1712.174	1.57
16	467077	469962	483417	483275	476961.833	7315.235	1.53
32	978012	968948	960625	986214	969922.833	10178.729	1.05
50	1428028	1425952	1407677	1433059	1419222.400	13832.520	0.97
<u>Coef</u>	0.9982	0.9986	0.9982	0.9979	0.9983	0.001	

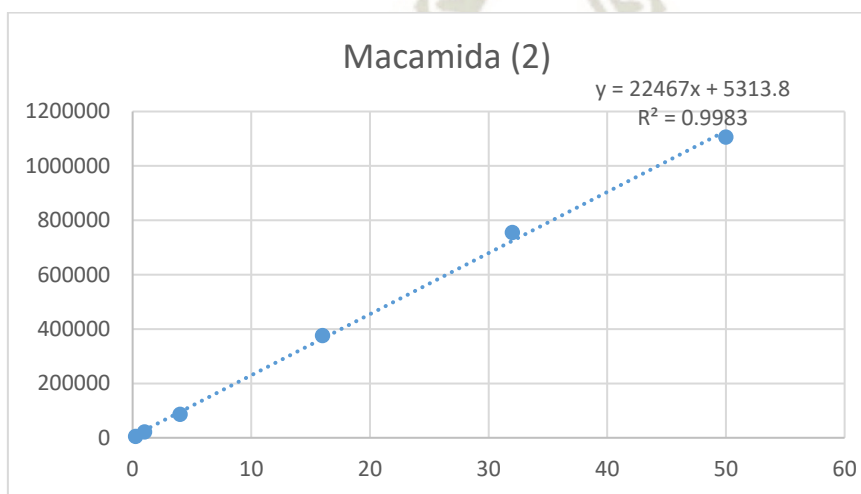
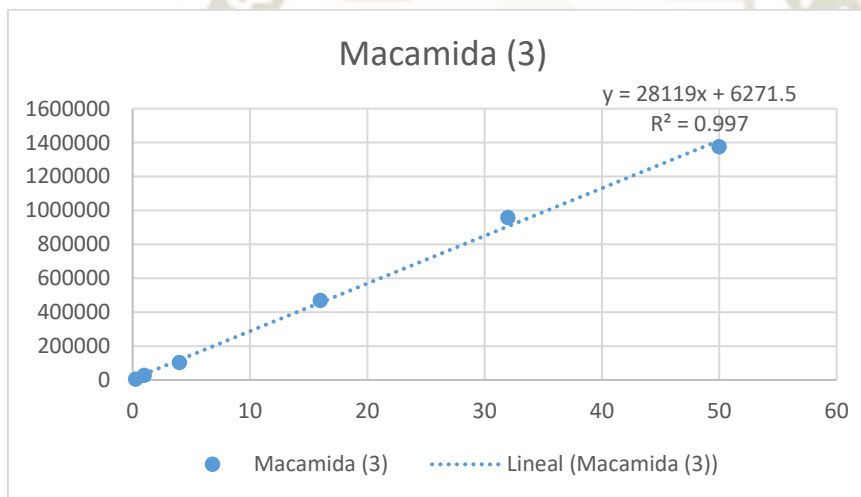
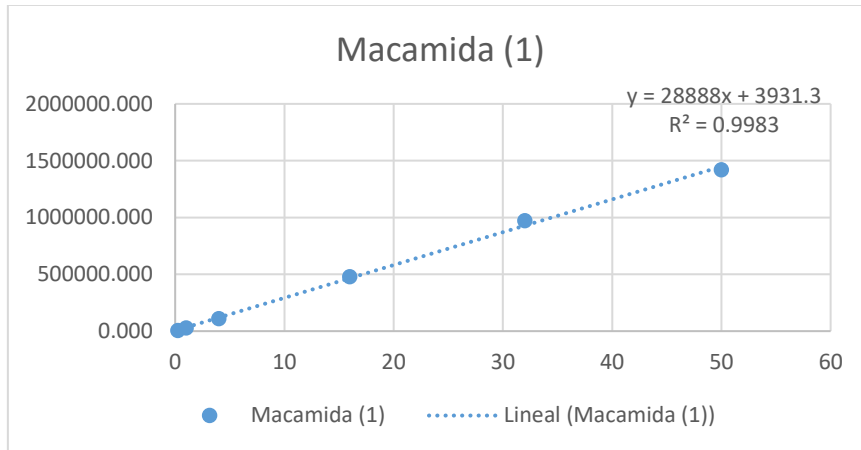
Concentración (ppm)	(3)				<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
TR (min)	20.083	20.087	20.113	20.103	20.104	0.027	0.14
0.25	4983	5162	4876	4845	4972	124.906	2.51
1	27830	27574	29245	28523	28293	750.674	2.65
4	105805	105855	101238	101408	103359.833	2069.262	2.00
16	440940	444661	524215	523353	469795.667	41850.837	8.91
32	882207	893333	1045617	1043290	959283.333	70960.261	7.40
50	1296981	1302919	1382080	1523117	1375194.2	91225.329	6.63
<u>Coef</u>	0.958608	0.95782643	0.9521517	0.95243104	0.95316601	0.93581728	

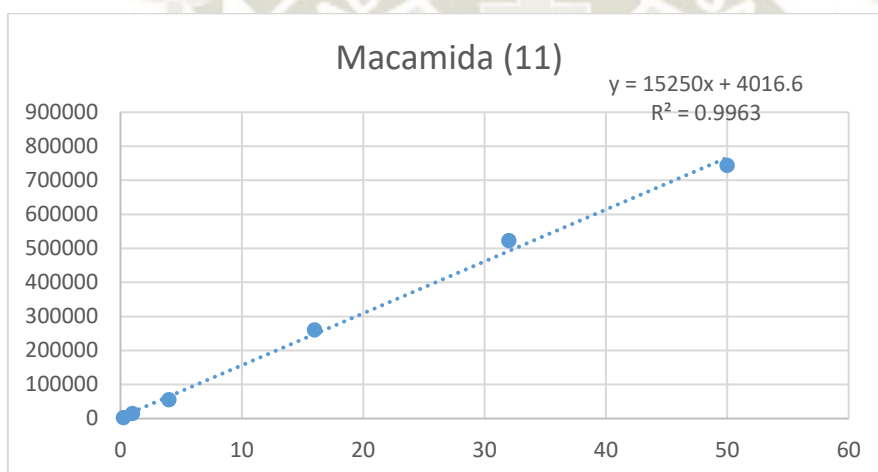
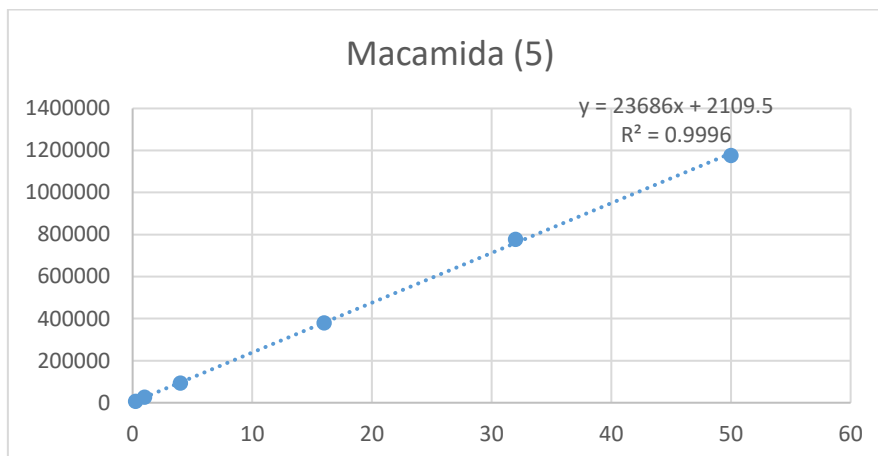
Concentración (ppm)	(2)				<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
TR (min)	20.753	20.763	20.77	20.757	20.76725	0.018	0.09
0.25	4692	5619	4686	4877	5051.6	425.997	8.43
1	21242	21800	21301	21576	22336	1344.410	6.02
4	91098	91409	82875	83720	86908.6667	3614.496	4.16
16	371923	372268	372259	371126	375948.4	9077.816	2.41
32	739963	744005	742330	741091	755412.167	21059.422	2.79
50	1076511	1083533	1121737	1082204	1105979.5	28528.451	2.58
<u>Coef</u>	0.9979	0.9980	0.9994	0.9981	0.9983	0.9912	

Concentración (ppm)	(5)				<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
TR (min)	26.03	26.08	26.037	26.033	26.0825	0.039	0.15
0.25	6312	6224	6488	6116	6000	459.293	7.65
1	26747	26208	23210	24133	25679	1606.135	6.25
4	92288	93488	85657	96826	93538.5	4303.589	4.60
16	361113	364683	409645	404901	379478	21765.472	5.74
32	731088	736970	822440	820643	777524.833	39206.298	5.04
50	1063985	1071308	1305302	1322982	1176049.5	112785.190	9.59
Coef	0.9982	0.9981	0.9998	0.9996	0.9996	0.9172	

Concentración (ppm)	(11)				<u>Promedio</u>	<u>DS</u>	<u>CV</u>
TR (min)	36.533	36.487	36.44	36.46	36.48	0.040	0.11
0.25	3075	2554	2826	3050	2791	233.519	8.37
1	14666	15129	13112	12907	14361.3333	1129.408	7.86
4	54553	55700	53888	55002	54866.5	641.080	1.17
16	259598	259600	235579	237617	259961.833	21122.866	8.13
32	527913	533493	475010	479098	522691.5	37813.513	7.23
50	792884	786460	696700	700030	744018.5	52798.821	7.10
Coef	0.9992	0.9986	0.9984	0.9982	0.9963	0.9848	

Representación gráfica de la relación del área de la absorbancia obtenida en función de la concentración de la macamida.





Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Bioquímica y Biología Molecular



**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS EN
TRES VARIEDADES DE *Lepidium meyenii* (MACA).**

*Proyecto de tesis presentado por la
bachiller:*

Paredes Fuentes, Julitza Lindsey

Para optar el Grado Académico de
Maestro en Bioquímica y Biología
Molecular

Arequipa – Perú
2017

I.- PREÁMBULO

El uso de plantas medicinales en el mundo y en especial en nuestro país que se caracteriza por una gran biodiversidad, se está incrementando día a día. *Lepidium meyenii* (maca) está considerada como la planta peruana con un alto potencial de bioprospección; en la última década, la exportación de maca aumentó en casi 5 veces a causa de la demanda de alimentos, en particular con beneficios para la salud, por lo que considero que el estudio de plantas con estos potenciales es de interés. Como químico farmacéutico he tenido la posibilidad de trabajar con varias de estas, siendo cautivada por el boom mundial relacionado con el *Lepidium meyenii* (maca).

Esta planta crece entre los 3000 a 4000 metros de altitud en las diferentes partes de la sierra peruana, lo que influye en la cantidad de principios activos presentes en su hipocótilo, esto debido a factores edafológicos, atmosféricos y climáticos. De aquí nace la idea de determinar las macamidas, principios activos del *Lepidium meyenii* (maca), en diferentes variedades de esta planta.

II.- PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. ENUNCIADO:

“Identificación y cuantificación de macamidas en tres variedades de *Lepidium meyenii* (maca)”

1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA:

El presente trabajo de investigación es descriptivo, dentro del área de la bioquímica de los metabolitos secundarios de las plantas con efectos farmacológicos. Tendrá como variables independientes las diferentes

variedades de *Lepidium meyenii* (maca) a analizar, así como su procedencia; y como variables dependientes la concentración de las diferentes macamidas presentes en el extracto pentánico.

1.3.JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA:

La determinación de las concentraciones de las macamidas presentes en las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (maca), nos permitirá en primer lugar estandarizar el contenido de principios activos de los preparados a base de este hipocótilo, factor relevante para el uso medicamentoso de dicha planta medicinal. Por otro lado, nos permitirá recomendar la variedad con mayor contenido de principios activos no solo en su uso sino también para su cultivo e industrialización.

Finalmente, el contar con una técnica estandarizada para la identificación y cuantificación de macamidas nos permitirá controlar e identificar adulteración y falsificaciones en productos comerciales a base de este hipocótilo. Así como estandarizar los productos farmacéuticos derivados de esta planta.

2. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Lepidium meyenii (Maca), de la familia Brassicaceae, es una planta herbácea cultivada en la Cordillera de los Andes Centrales de nuestro país a aproximadamente 3.500-4.500 metros de altitud ¹. Algunos autores apuntaron propiedades farmacológicas de la Maca en el sistema reproductivo con aumento de la fertilidad ^{2,3,4,5}, en el rendimiento sexual y función eréctil ⁶, en la disminución de la ansiedad y depresión en las mujeres después de la menopausia⁷, además de la capacidad estrogénica ⁸, y presentó también, una función anti-proliferativa de la próstata ^{9, 10,11}. La administración de la Maca también redujo los efectos producidos por el estrés, con el aumento de los niveles de corticosterona, y otros parámetros relacionados como el tamaño de

las glándulas suprarrenales y úlceras inducidas por estrés, hasta la disminución de los ácidos grasos libres y niveles de glucosa plasmática ¹². La lipofilidad de muchos compuestos de la Maca sugiere actividad sobre el sistema nervioso, con eso, los efectos sobre el aprendizaje y memoria fueron estudiados en ratas ovariectomizadas ¹³ y en ratas con problemas de memoria inducida por escopolamina ¹⁴.

La maca es rica en metabolitos vegetales secundarios, esto podría explicar los efectos biológicos que se le atribuyen ¹⁵. Los macaenos y las macamidas específicos de esta planta, son los principales compuestos activos ^{16,17}. La Maca puede ser citoprotectora en condiciones de estrés oxidativo al eliminar radicales libres ^{18,19}. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (en las formas de superóxido, radical hidroxil, peroxil, H₂O₂ y peroxinitrito) están implicadas en la etiología de las enfermedades degenerativas en función de la excesiva producción y liberación de neurotransmisores excitatorios, la maca podría prevenir la formación de los ROS/RNS. ¹⁹

Estudios realizados por Alejandro Pino profesor del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS), en Boston – EUA. demostraron la actividad neuroprotectora de los extractos de Maca *in-vitro*, en neuronas sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂ e *in vivo*, en ratas sometidas a accidente vascular cerebral isquémico. Se demostró que las macamidas, los principales compuestos activos de la maca, actúan a través del sistema cannabinoide, inhibiendo el Ácido graso amida hidrolasa (FAAH), lo que sugiere que pueden actuar en el sistema nervioso central contra el daño oxidativo en la protección de las neuronas ^{20, 21,22}, esto nos orientan a nuevas investigaciones sobre los agentes de la maca en la prevención, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, sentimos la necesidad de investigar como el *Lepidium meyenii* (Maca) y sus compuestos específicos (macamidas) podrían proporcionar la neuroprotección, así como también, modificar la expresión de genes involucrados en la producción de A β sobre los mecanismos de acción moleculares, dosis y toxicidad.

McCollom y colaboradores (2005), analizaron las principales macamidas en muestras de *Lepidium meyenii* por HPLC; en dicha investigación se consignaron cuatro muestras que fueron obtenidas de diferentes vendedores en Pisac-Perú, dichos hipocótilos fueron identificados, secados y pulverizados; para proceder a la extracción de los analitos con éter de petróleo en un shaker por 24 horas a 150rpm, seguidamente los extractos fueron filtrados y evaporados a sequedad para el análisis cromatográfico.²³

En el 2014, Chain y colaboradores de la Universidad de Tucumán-Argentina, analizaron el extracto no polar de los hipocótilos de *Lepidium meyenii*. Para ello se preparó un extracto a partir de 180g de hipocótilos silvestres secados a temperatura ambiente por el Método de Soxhlet con n-hexano, se evaporó el solvente y el extracto crudo fue sometido a una hidrólisis alcalina y el residuo se acetiló con anhídrido acético en piridina seca durante 24 horas. La cromatografía en columna (CC) del extracto acetilado produjo una fracción que contiene una mezcla de macamidas las cuales se analizaron por LC-MS mostrando la presencia de 12 amidas.²⁴

Recientemente, Eliana Esparza y colaboradores, publicaron los efectos del proceso de secado en los niveles de las macamidas bioactivas y de sus posibles precursores metabólicos durante el secado tradicional e industrial post cosecha. El secado del tejido vegetal, es un complejo proceso bioquímico en el cual el grado de daño a los tejidos y las reacciones subsiguientes durante la desecación determina la composición y viabilidad del producto. En este trabajo los diferentes tipos de muestra – hipocótilos fueron congelados con nitrógeno líquido y molidos, una porción de un gramo fue colocada en botellas de centrífuga de polipropileno que contenían H₂O-MeOH precalentado a 70 °C. Se colocaron en un baño de agua a 70 °C, con agitación, durante 1h. Luego se centrifugó durante 15 min, el sobrenadante fue filtrado al vacío para ser almacenado en tubos de cultivo de vidrio.²⁵

3. OBJETIVOS

- 5) Obtener el extracto pentánico de las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (Maca).

- 6) Estandarización del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Performance para la determinación de macamidas.
- 7) Identificar y cuantificar macamidas en tres variedades de *Lepidium meyenii* (maca).

4. HIPÓTESIS

Dado que la composición en metabolitos secundarios de una planta medicinal depende de su fenotipo, es probable que las diferentes variedades de *Lepidium meyenii* (Maca) presenten diferente composición en macamidas

III. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras serán conseguidas del departamento de Junín y estarán constituidas de las variedades amarilla, roja y negra. Se intentará muestrear la planta entera para su respectiva identificación.

Los hipocótilos secados de forma artesanal serán limpiados y triturados para la respectiva extracción.

1.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MACAMIDAS

Una vez obtenidas las muestras trituradas se procederá a la extracción con metanol por método de Soxhlet. Seguidamente se realizará una extracción continua líquido-líquido con solvente orgánico (pentano), en el cual serán extraídos compuestos lipofílicos como las macamidas. Finalmente se procederá a la concentración del extracto para la identificación y cuantificación de macamidas.

1.3. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MACAMIDAS

Las diferentes macamidas serán donadas por el Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University (MCPHS), Boston – USA para la estandarización y cuantificación de macamidas en los extractos obtenidos.

Se realizarán las pruebas correspondientes para la determinación de la fase móvil, flujo de corrida y tiempo de corrida. Seguidamente se procederá a la construcción de la curva de calibración y estandarización del método analítico.

Finalmente se identificarán y cuantificarán las macamidas presentes en los extractos obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

70. Flores, S.E.; Walker, T.S.; Guimarães, R.L.; Vivanco, J.M. “Raíces y tubérculos andinos.” *Hortiscience*. 2003, v.38, n. 2, p. 161-167.
71. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Córdava, A; Chung, A.; Rubio, J.L. “Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m)”, *Journal of Endocrinology*. 2004, v. 180, n. 1, p.87–95.
72. Bustos-Obregón, E.; Yucra, S.; Gonzales G.F. “*Lepidium meyenii* (maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice”, *Asian Journal of Andrology*. 2005. v. 7, n.1, p. 71–76.
73. Chung, F.; Rubio, J.; Gonzales, C.; Gasco, M.; Gonzales, G.F. “Dose–response effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats”. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. v. 98, p. 143–147.

74. Yucra, S.; Gasco, M.; Rubio, J.; Nieto, J.; Gonzales, G.F. “Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats.” *Fertil Steril*. 2008; v.89, s.5, p.1461-7
75. Zenico, T.; Cicero, A.F.; Valmorri, L.; Mercuriali, M.; Bercovich, E. “Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial.” *Andrologia*. v.41, s.2, p.95-9, 2009.
76. Brooks, N.A.; Wilcox, G.; Walker, K.Z.; Ashton, J.F.; Cox, M.B.; Stojanovska, L. “Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content”. *Menopause*. 2008. v.15, s.6, p.1157-62.
77. Valentova, K.; Buckiova, D.; Kren, V.; Peknicova, J.; Ulrichova, J.; Simanek, V. “The in-vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts.” *Cell Biol Toxicol*. 2006. v.22, s.2, p.91-9.
78. Gonzales, C.; Rubio, J.; Gasco, M.; Nieto, J.; Yucra, S.; Gonzales, G.F. “Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats.” *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. v. 103, p. 448–454.
79. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Malheiros-Pereira, A.; Gonzales-Castañeda, C. “Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice”. *Andrología*. 2008. v.40, s.3, p.179-85.
80. Gonzales, G.F.; Miranda, S.; Nieto, J.; Fernández, G.; Yucra, S.; Rubio, J. et al. “Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats.” *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005. v.3, n.1, p. 5.
81. López-Fando, A.; Gómez-Serranillos, M.P.; Lock, I.O.; Upamayt, U.P.; Carretero, M.E. “*Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress.” *Phytotherapy Research*. 2004. v. 18, p. 471–474.
82. Rubio, J.; Dang, H.; Gong, M.; Liu, X.; Chen SL, Gonzales GF. “Aqueous and hydroalcoholic extracts of black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice.” *Food Chem Toxicol*. 2007 Oct;45(10):1882-90.

83. Rubio, J.; Qiong, W.; Liu, X.; Jiang, Z.; Dang, H.; Chen, S.L.; Gonzales, G.F. “Aqueous extract of black Maca (*Lepidium meyenii*) on memory impairment induced by ovariectomy in mice.” *Evid Based Complement Alternat Med*. Oct 9 2008
84. Wang, Y.; Mcneil, B; Harvey, L.M. “Maca: an Andean crop with multi-pharmacological functions.” *Food Res Int*. 2007. v. 40, p. 783-792.
85. Zheng, B.L.; He, K.; Kim, C.H.; Rogers, L.; Shao, Y.; Huang, Z.Y.; Lu, Y.; Yan, S.J.; Qien L.C.; Zheng, Q.Y. “Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats.” *Urology*. 2000. v. 55, n. 4, p. 598–602.
86. Li, G.; Ammermann, U.; Quirós, C.F. “Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products” *Econ. Bot*. 2001. v. 55, p. 225–262.
87. Lee K.J.; Dabrowski, K.; Sandoval M.; Miller, M.J.S. “Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their anti-oxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles.” *Aquaculture*. 2005. v. 244, p. 293–301.
88. Sandoval, M.; Okuhama, N.N; Angeles, F.M.; Melchor, V.V.; Condezo, L.A.; Lao, J.; Miller, M.J.S. “Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*).” *Food Chem*. 2002. v.79, p. 207–213.
89. Nguyen, D.; Pino-Figueroa, a.J.; Maher, T.J. “In vitro evaluation of the neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (maca) in crayfish neuronal and rat neuroblastoma cell lines.” *FASEB J*. 23:947.4, 2009.
90. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-Figueroa A. The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol*. 2013 Oct;48(2):333-9. doi:10.1007/s12035-013-8499-2. Epub 2013 Jul 14.
91. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. “Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition.” *Bioorg Med Chem*.2013 Sep 1;21(17):5188-97. doi: 10.1016/j.bmc.2013.06.034. Epub 2013 Jun 27.

92. Megan M. McCollom, Jacquelyn R. Villinski, Kerry L. McPhail, Lyle E. Craker and Stefan Gafner. “Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS” *Phytochem. Anal.* 16 (2005), pag 463–469
93. Fernando E. Chain, Alfredo Grau, Jose C. Martins , Cesar A.N. Catalán. “Macamides from wild ‘Maca’, *Lepidium meyenii* Walpers (*Brassicaceae*)”. *Phytochemistry Letters* 8 (2014) pag 145–148.
94. Eliana Esparza, Antonella Hadzich, Waltraud Kofer, Axel Mithofer, Eric G. Cosio. “Bioactive maca (*Lepidium meyenii*) alkamides are a result of traditional Andean postharvest drying practices” *Phytochemistry* (2015)

