

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL PERÚ**

Escuela de Posgrado



**El catabolismo de glucosinolatos durante el secado
postcosecha determina la proporción final de amidas y
bencenoides bioactivos en harina de maca
(*Lepidium meyenii*)**

Trabajo de investigación para obtener el grado académico de Magistra
en Ingeniería y Ciencia de los Materiales que presenta:

Eliana Esparza Ballón

Asesor:

Eric Gabriel Cosio Caravasi


Lima, 2023

Informe de Similitud

Yo, Eric Gabriel Cosio Caravasi, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú y asesor del trabajo de investigación titulado **“El catabolismo de glucosinolatos durante el secado postcosecha determina la proporción final de amidas y bencenoides bioactivos en harina de maca”**, de la autora Eliana Esparza Ballón, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 19 %. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 08/03/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

San Miguel, 08 de marzo de 2023

Apellidos y nombres del asesor: <u>Cosio Caravasi, Eric Gabriel</u>	
DNI: 06416780	Firma 
ORCID: 0000-0001-6993-5654	

RESUMEN

El procesamiento postcosecha de raíces de maca (*Lepidium meyenii* Walp., Brassicaceae), un cultivo tradicional altoandino, implica un secado lento en el campo antes de la molienda para producir harina. La deshidratación progresiva de los tejidos y la liberación de enzimas hidrolíticas y sustratos de los compartimentos celulares da como resultado la acumulación lenta de monosacáridos, ácidos grasos y aminoácidos libres. Un perfil cinético más complejo y rápido es el de la degradación de glucosinolatos. Durante el secado se generan una serie de productos de acumulación estables, y también intermediarios reactivos, algunos de los cuales tienen propiedades bioactivas notables. Entre estos se encuentran las macamidas, inhibidores de la degradación de los neurotransmisores endocannabinoides en el sistema nervioso de los mamíferos. Las macamidas son el resultado de la condensación de bencilamina, un producto de hidrólisis de glucosinolatos, con ácidos grasos liberados por la hidrólisis de lípidos. Investigaciones recientes se han centrado en desarrollar procesos de secado en condiciones controladas que puedan modular la bioquímica de la hidrólisis de glucosinolatos para optimizar el contenido de compuestos bioactivos en la harina de maca. El secado de maca triturada en horno a temperatura moderada (35 °C) bajo un flujo de aire controlado genera bencilamina como producto primario de acumulación, que representa hasta el 94% del glucosinolato hidrolizado en la harina. La evidencia cinética sugiere que tanto los bencenoides desaminados como las macamidas, que representan menos del 5% de glucosinolato hidrolizado, se generan a partir de la bencilamina acumulada a través de la actividad de amina oxidasas o por la condensación con ácidos grasos libres, respectivamente. Etapas posteriores de deshidratación resultan en cambios en las proporciones molares de los distintos bencenoides desaminados, tales como ésteres de ácido benzoico y alcohol bencílico. En este reporte se propone que estos son el resultado de cambios en las tasas de las semirreacciones reductivas y oxidativas de aldehído-deshidrogenasas endógenas y que es la relación entre la desaminación de bencilamina o de su condensación a amidas lo que determina los rendimientos finales de macamidas en relación con bencenoides y sus ésteres en la harina de maca. Las condiciones redox durante el secado determinan, por lo tanto, el perfil bioactivo y calidad de la harina de maca generada, y son factores a tomar en cuenta para una eventual estandarización de este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mis padres, a Javier y Salvador por todo este tiempo y apoyo constante.

A Eric Cosio, por su asesoría constante y la presión necesaria para salir adelante.

A Rolf Grieseler, por darme la oportunidad de preparar este trabajo final.

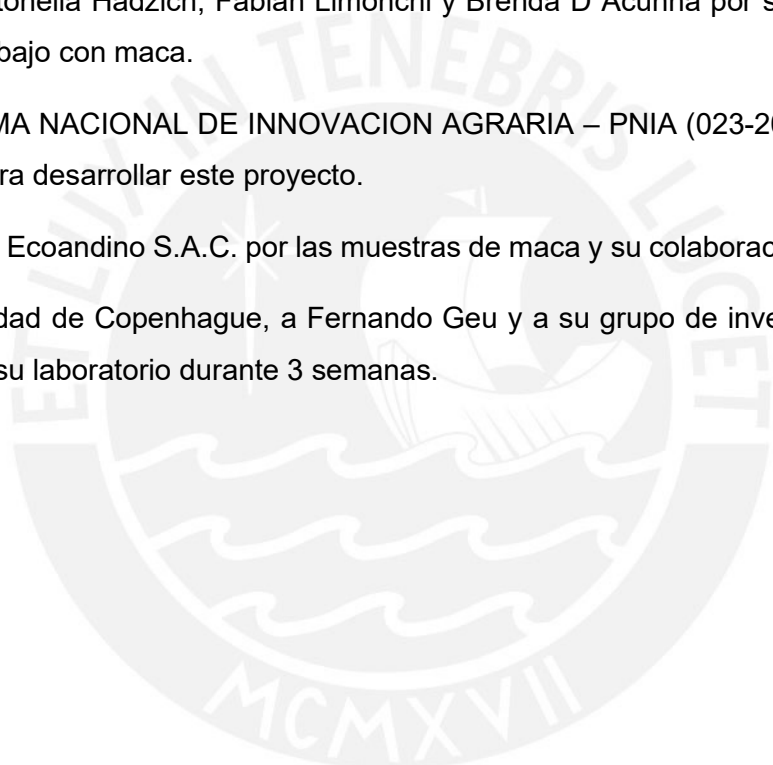
A Ramzy Kahhat, por darme el impulso necesario.

A Winnie Yi, Silvia Valderrama y Héctor Flores por todo su trabajo de laboratorio y campo. A Antonella Hadzich, Fabian Limonchi y Brenda D'Acunha por su apoyo en el tiempo de trabajo con maca.

Al PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACION AGRARIA – PNIA (023-2016-PNIA) por los fondos para desarrollar este proyecto.

A la Empresa Ecoandino S.A.C. por las muestras de maca y su colaboración constante.

A la Universidad de Copenhague, a Fernando Geu y a su grupo de investigación, por recibirme en su laboratorio durante 3 semanas.



ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Parte Experimental	4
2.1 Procedimientos generales e instrumentación	4
2.2 Reactivos	4
2.3 Material vegetal	4
2.4 Experimentos de secado al horno	4
2.5 Extracción de material vegetal	5
2.6 Análisis de amidas y ácidos grasos libres	5
2.7 Análisis de bencilamina y aminoácidos libres	6
2.8 Análisis de glucosinolatos	6
2.9 Análisis de metabolitos volátiles (VOCs)	7
2.10 Análisis de productos hidrolíticos de glucosinolatos	8
2.11 Extracción y análisis de ácido benzoico	8
2.12 Hidrólisis de ésteres de ácido benzoico	9
2.13 Análisis de amoníaco	9
3. Resultados	10
3.1 Perfil en el tiempo de productos hidrolíticos volátiles (VOCs) de glucosinolatos	10
3.2 La bencilamina es el principal producto de acumulación de la hidrólisis de glucosinolatos en raíces secas de maca.	14
3.3 La desaminación es el punto de inflexión para la formación de macamidas o de bencenoides.	17
4. Discusión	21
4.1 La reserva de bencilamina surge de la hidrólisis de isotiocianato mientras los tejidos aún se encuentran en una etapa hidratada.	21
4.2 ¿Los bencenoides de maca son generados por una aldehído-deshidrogenasa que actúa en un patrón de reacción bio-Canizzaro?	23
5. Conclusiones	26
6. Bibliografía	28
7. Anexos	32
8. Publicación final en la revista Phytochemistry	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bencil glucosinolato (1) y metabolitos postcosecha hidrolíticos mencionados en el texto.	3
Figura 2. Cámara de flujo para monitorear los VOCs del espacio de cabeza durante el proceso de secado.	11
Figura 3. Evolución temporal de los principales VOCs de la hidrólisis de glucosinolatos medidos por SPME-GC-MS de espacio de cabeza.	12
Figura 4. Concentraciones tisulares durante el secado en horno para bencilglucosinolato (BGL) y sus metabolitos.	15
Figura 5. Valores de correlación de Pearson para productos hidrolíticos de glucosinolatos.	17
Figura 6. Perfiles de curso de tiempo para productos bencenoides desaminados transitorios y finales en el secado de tejidos de maca.	19
Figura 7. Evolución temporal de la concentración de ion amonio en tejidos de maca durante el secado.	20
Figura 8. Esquema propuesto para las reacciones que tienen lugar durante el secado de la maca.	21
Figura 9. Mecanismo de hidrólisis térmica de bencilisotiocianato para formar bencilamina.	22
Figura 10. Esquema de reacción para la formación de bencil alcohol y ácido benzoico.	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla S1. Gradiente de solventes de HPLC para la separación de macamidas	32
Tabla S2. Condiciones para las señales SIM positivas y negativas en APCI-MS	33

1. INTRODUCCIÓN

El tradicional procesamiento postcosecha de muchas plantas crucíferas implica daño a los tejidos por maceración, fermentación o secado (Rabie et al., 2011; Palani et al., 2016). Los metabolitos de descomposición de los glucosinolatos son relevantes para las propiedades y el uso final que los humanos les dan a estos productos (Traka, 2016).

El metabolismo de los glucosinolatos ha recibido considerable atención en los últimos años como respuesta defensiva de las plantas contra los herbívoros, por su impacto en el tracto digestivo humano y en el estudio del reciclaje de glucosinolatos en células vegetales (Fechner et al., 2018; Gimsing & Kirkegaard, 2009; Wittstock et al., 2016; Platz et al., 2015). La maca (*Lepidium meyenii* Walp., Brassicaceae), es la raíz de una planta andina de uso ancestral que está muy bien adaptada al duro entorno de gran altitud, por encima de los 4000 m.s.n.m., donde suele cultivarse. Ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con sus componentes bioactivos con propiedades beneficiosas sobre la fertilidad, la cognición y el manejo de la energía, entre otros (Yábar et al., 2011).

Su procesamiento postcosecha tradicional consiste en secar las raíces en campo abierto durante un período de hasta 12 semanas durante las cuales se someten a ciclos de congelación y descongelación, una intensa exposición a la radiación solar y una dura manipulación mecánica. El material seco resultante luego se muele para formar la harina. Las raíces de maca varían considerablemente en tamaño y, en consecuencia, sus tiempos de secado varían y requieren clasificación y recolección del material seco a medida que avanza el proceso.

En un informe previo (Esparza et al., 2015) se hizo una caracterización inicial de los procesos hidrolíticos de glucosinolatos y lípidos que dan como resultado el perfil químico final de la harina de maca seca. También se proporcionó la primera evidencia del origen exclusivamente postcosecha de las bencilcamidas, macamidas, presentes en las raíces secas, como un producto de condensación de bencilamina (BNH₂, **3**), un metabolito de descomposición del bencilglucosinolato (BGL, **1**), con ácidos grasos libres generados durante el proceso de secado (Figura 1). El trabajo posterior de otros grupos (Chen et al., 2017; Zhang et al., 2020) proporcionó información sobre el impacto del preprocesamiento mecánico del material vegetal y la temperatura de secado en los rendimientos de macamida (**9–13**) en condiciones de laboratorio. Sin

embargo, la hidrólisis de glucosinolatos es un proceso rápido que, en el secado de tejidos, tiene lugar continuamente a medida que avanza la deshidratación y la destrucción celular. Nuestro conocimiento actual del catabolismo de glucosinolatos proviene de modelos en bacterias, insectos, mamíferos y plantas (Blázević et al., 2020; Wittstock et al., 2016; Jeschke et al., 2016; Sørensen et al., 2016; Tang et al., 1972; Yábar et al., 2011). El secado de las raíces de maca ofrece información potencialmente interesante sobre la secuencia de reacciones, catalizadas por enzimas o espontáneas, que determinan el perfil químico en la harina de raíces de Brassicaceas.

La liberación de productos de degradación de glucosinolatos durante el secado, y su asignación a varias secuencias metabólicas, tiene lugar en un entorno donde el potencial hídrico, el pH y el estado redox están cambiando lentamente y donde hay incrementos progresivos en las concentraciones de azúcares libres y ácidos grasos. Las condiciones predominantes en el tejido pueden promover la condensación de bencilamina a ácidos grasos libres y la formación de amidas bioactivas, o pueden conducir a la desaminación y formación de una variedad de bencenoides alternativos. Estos dos resultados pueden considerarse competitivos y sus tasas dependen de la reserva existente de bencilamina y de los mecanismos por los cuales se pueden formar bencenoides a partir de bencilamina o, quizás, directamente a partir del bencilisotiocianato (**2**), el principal producto transitorio de degradación de glucosinolatos en la maca. El presente trabajo proporciona una secuencia temporal detallada de los metabolitos formados a partir de la degradación de glucosinolatos en los tejidos y durante el secado, bajo condiciones controladas, y propone una secuencia de vías competitivas que pueden modular el perfil bioquímico y las propiedades bioactivas y sensoriales de la harina terminada de maca.

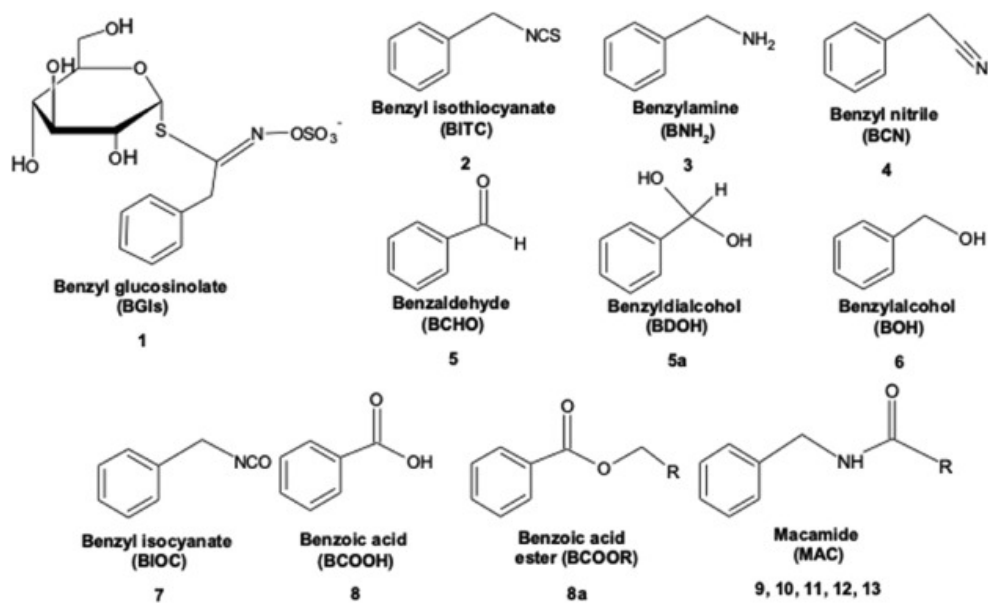


Figura 1. *Bencil glucosinato (1) y metabolitos postcosecha hidrolíticos mencionados en el texto. Para macamidas R = ácido palmítico (9), ácido esteárico (10), ácido oleico (11), ácido linoleico (12), ácido linolénico (13).*

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Procedimientos generales e instrumentación

La caracterización estructural de amidas sintéticas se realizó utilizando un Bruker 500 UltraShield NMR (Karlsruhe, Alemania), un espectrómetro PerkinElmer serie 1600 FT-IR (Waltham, MA) y un espectrofotómetro UV/Vis Thermo Spectronic Genesys 6 (Rochester, NY). La recopilación de datos de variables ambientales para experimentos de secado en horno utilizó unidades OM-62 de Omega Engineering (Stamford, CN), para condiciones ambientales de laboratorio y un sistema XR5 SE de Pace Scientific (Mooresville, NC) equipado con un sensor de temperatura y humedad TRH-100 para el interior del horno de secado. El tratamiento estadístico y los análisis de regresión no lineal se realizaron utilizando SigmaPlot 11 para Windows (Systat Software).

2.2. Reactivos

El bencilglucosinolato (BGL, **1**) se obtuvo de Calbiochem/Merck Biosciences (San Diego, CA). El bencilisotiocianato (BITC, **2**), el bencilnitrilo (BCN, **4**), el bencilalcohol (BOH, **5**), el benzaldehído (BCHO, **6**), el bencilisocianato (BIOC, **7**), los ácidos grasos y los reactivos para la síntesis de amida se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El ácido benzoico (BCOOH, **8**) y la bencilamina (BNH₂, **3**) eran de Merck (Darmstadt, Alemania). Las bencilamidas de los ácidos palmítico (MAC16, **9**), esteárico (MAC18, **10**), oleico (MAC18-1, **11**), linoleico (MAC18-2, **12**) y linolénico (MAC18-3, **13**) fueron sintetizadas en nuestro laboratorio para ser utilizados como estándares según Esparza et al. (2015). Todos los demás disolventes y reactivos eran de calidad analítica o HPLC.

2.3. Material vegetal

Las raíces frescas de maca amarilla se obtuvieron de un mercado local y se originaron en la región de Junín en el centro de Perú. Se realizaron pruebas de secado en horno en laboratorio utilizando raíces de maca de tamaño uniforme, aproximadamente 3 cm de diámetro. Estos se lavaron con H₂O destilada, se secaron con papel de filtro y se rallaron manualmente en tiras de 2 mm usando un rallador de vegetales de cocina de acero inoxidable.

2.4. Experimentos de secado al horno

Se colocaron 640 g de raíces de maca fresca rallada en dieciséis bandejas de malla de acero inoxidable de 100 cm² (40 g peso fresco/bandeja) y fueron

colocadas en un horno de 70 l a 35 °C. Se bombeó aire húmedo al horno a través de una trampa de carbón activado y una cámara con agua destilada, ambos a temperatura de laboratorio (22 °C). Se tomaron muestras aleatorias por duplicado a las 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h, que se mezclaron suavemente para homogeneizarlas y se separaron en muestras por duplicado, se pesaron y almacenaron en bolsas de papel de aluminio en N₂ líquido hasta su análisis por HPLC y GC–MS. La muestra de tiempo cero se trituró directamente en N₂ líquido para su almacenamiento. Se llevaron a cabo tres experimentos de secado independientes en diferentes momentos y los resultados presentados aquí son valores promedio (N = 6).

2.5. Extracción de material vegetal

Muestras de maca triturada (1 g), congelada en N₂ líquido, se colocaron en tubos de centrífuga de polipropileno (15 ml) que contenían H₂O-MeOH (10 ml, 30:70, v/v) precalentados a 70 °C. Los tubos se burbujearon con gas N₂, se cerraron, se colocaron en un baño de agua caliente a 70 °C durante 10 min y luego se sonicaron durante 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 x g por 15 min. El sobrenadante se filtró al vacío a través de filtros Whatman GF/A y el filtrado se recogió en tubos de cultivo de vidrio (50 ml) con tapas revestidas de teflón. El precipitado se volvió a extraer durante 10 min y los sobrenadantes filtrados se agruparon. Las muestras se almacenaron en N₂ a -20 °C hasta su análisis.

2.6. Análisis de amidas y ácidos grasos libres

Se analizaron macamidas (9–13) y ácidos grasos insaturados libres utilizando una modificación de los métodos previamente reportados (Esparza et al., 2015; Ganzera et al., 2002; McCollom et al., 2005). Las muestras se disolvieron en H₂O-MeOH (7 ml, 50:50, v/v) y se cargaron en una columna SPE de fase reversa Merck Lichrolut RP-18 (500 mg). Las columnas se lavaron con 5 ml de H₂O-MeOH (50:50, v/v) y se eluyeron con 2 ml de MeOH. El eluato se analizó en un sistema de bomba cuaternaria Agilent Infinity 1290 UPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos en serie con un detector de masas de cuadrupolo simple Agilent 6120 mediante ionización química a presión atmosférica (APCI). Las condiciones del instrumento fueron: temperatura del gas de secado 250 °C, temperatura de vaporización 400 °C, flujo de gas de secado 9,0 l min⁻¹, presión de nebulización 25 psi, voltaje capilar (positivo) 4000 V, (negativo) 4000 V, Corona (positivo) 4 µA, (negativo) 4 µA. Señales en *full scan* 80–550 m/z, modo

APCI, (50% de tiempo cada polaridad), señales en modo SIM (consultar el material complementario de la Tabla S1).

Las muestras (10 μ l) se inyectaron en una columna Merck LiChrospher 100 RP-18, 150 mm \times 4,6 mm i.d. (5 μ m). El calentador de la columna se fijó a 40 $^{\circ}$ C y el flujo fue de 1 ml min^{-1} . El programa de solventes se muestra en la Tabla S2. Los resultados presentan las macamidias totales como una suma de los compuestos **9–13**.

2.7. Análisis de bencilamina y aminoácidos libres

Las aminas se analizaron por derivatización con *o*-ftaldialdehído (OPA, Sigma, St. Louis, MO) seguido de HPLC en fase reversa. El reactivo contenía OPA (27 mg) en MeOH (0,5 ml) diluido con *buffer* de borato de sodio (5 ml) y 2-mercaptoetanol (25 μ L). Cada extracto de MeOH agrupado (180 μ l) se diluyó con *buffer* borato de sodio 0,4 M (25 μ l, pH 9,5) y se usaron 20 μ l de tiramina 0,1 mg ml^{-1} como estándar interno, antes de agregar el reactivo OPA (25 μ l). La mezcla se agitó durante 1 min, se centrifugó durante 2 min a temperatura ambiente y se inyectaron 10 μ l para el análisis por HPLC. El instrumento de HPLC utilizado fue un Agilent 1260 Infinity II. La columna utilizada fue una Merck LiChrospher 100 RP-18, 125 mm \times 4,6 mm i. d. (5 μ m). La temperatura del horno se mantuvo a 30 $^{\circ}$ C y la detección se realizó a 340 nm. El sistema disolvente constaba de MeOH (solvente A) y *buffer* NaOAc 20 mM, pH 6,0 (solvente B). El programa consistió en un gradiente de 9 min de 40% a 100% A y 4 min a 100% A (Esparza et al., 2015; Simons y Johnson, 1978).

2.8. Análisis de glucosinolatos

El bencilglucosinolato (**1**) se analizó como su producto desulfatado con una ligera modificación de la literatura (Brown et al., 2003; Møldrup et al., 2011). Un ml de los extractos de hipocotilo, obtenidos como en 2.5, se diluyó en MeOH-H₂O (50:50, v/v) mediante la adición de 0,5 ml de agua. Se aplicó una alícuota de 1,5 ml en columnas Agilent Bond Elut-SAX SPE acondicionadas (500 mg). Estos últimos se lavaron secuencialmente con MeOH-H₂O (5 ml, 70:30, v/v) y luego se acondicionaron con *buffer* MES 0,02 M (Sigma, St. Louis, MO) (1 ml, pH 5,2) después de lo cual 150 μ l (Se añadieron 150 unidades) de sulfatasa (H-1, *Helix pomatia*, Sigma, St. Louis, MO) y las columnas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los desulfoglucosinolatos se eluyeron secuencialmente con MeOH-H₂O (800 μ l, 70:30, v/v) y H₂O (800 μ l). Ambos eluatos se agruparon en viales de muestreador automático de 2 ml y se usaron

directamente para el análisis. El análisis de HPLC se realizó utilizando un Merck LiChrospher 100 RP-18, 250 mm × 4,6 mm i. d. (5 µm) de columna, temperatura del calentador de columna de 30 °C y caudal de 1 ml min⁻¹. Se inyectaron 20 µl de muestra y se controló la elución a 230 nm. El programa de gradiente utilizó CH₃CN (solvente A) y H₂O (solvente B) y fue el siguiente: 6 min de 2 % A a 5 % A, 2 min de 5 % A a 7 % A, 10 min de 7 % A a 21 % A, 5 min 21% A a 29% A, 2 min 29% A a 100% A y 2 min a 100% A (Brown et al., 2003).

2.9. Análisis de metabolitos volátiles (VOCs)

Se realizó microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME) de la recámara utilizando fibras de sílice fundida recubiertas con una capa de 30 µm de DVB/Carb/PDMS (divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano) (Supelco, Bellefonte, PA). Las fibras se acondicionaron siguiendo las instrucciones del fabricante mediante exposición en el puerto de inyección del GC a 270 °C durante 30 min. Para el análisis, se colocó maca rallada (10 g) en una cámara de vidrio cilíndrica cerrada de 600 ml con 6 puertos de vidrio con tapón de rosca: dos para entrada y salida de flujo de aire, tres para muestreo de volátiles con septos de PTFE y uno para un sensor de temperatura y humedad (Figura 2). La cámara se colocó en una estufa a 35 °C, se proporcionó un flujo de aire constante (40 ml min⁻¹) mediante una bomba de acuario y se filtró previamente con un filtro de carbón activado. Se introdujeron fibras SPME a través de los septos para exponerlos al espacio de cabeza interior. Las fibras de SPME se expusieron al espacio de cabeza durante 15 min. Se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo (de 0 a 8 h, cada hora, de 8 a 72 h, cada 3 h) para su análisis mediante análisis de GC-MS de espacio de cabeza.

Después de la exposición, las fibras se insertaron en el puerto de inyección del GC para análisis y exposición durante 8 min. El análisis GC-MS se realizó con un GC Agilent 7890 B acoplado a un MSD de cuadrupolo simple 5977. El GC estaba equipado con una columna VF-23 ms (30 m × 0,25 mm, espesor de película de 0,25 µm). La temperatura del inyector se fijó en 250 °C, *splitless*, y el flujo del gas portador de He fue de 1 ml min⁻¹. La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 45 °C durante 4 min, y luego se elevó a 190 °C a 15 °C min⁻¹, luego a 240 °C a 30 °C min⁻¹ y finalmente se mantuvo durante 2 min a 240 °C. La ionización de electrones se fijó en 70 eV. La identificación de los compuestos se realizó mediante el uso de estándares puros, índices de retención y mediante análisis espectral de masas utilizando AMDIS 32 (versión

2.69, NIST), el programa de búsqueda espectral de masas NIST y la biblioteca de espectros de masas NIST 2011.

2.10. Análisis de productos hidrolíticos de glucosinolatos

Se extrajeron muestras de maca rallada (1 g) con 20 ml de CH_2Cl_2 en un baño de ultrasonido (Branson 5800, Danbury, CT) fijado a 30 °C y 40 Hz durante 1 h. El sobrenadante se filtró a través de una columna de sulfato de sodio con un filtro GF/A a un tubo de vidrio de 50 ml. Para el análisis de los compuestos de menor abundancia (**4,5,6,7**), los extractos se analizaron mediante GC-MS en un Agilent 7890 B equipado con un inyector multimodo (MMI) en modo *solvent-vent*. Se inyectaron muestras (25 μl) y el inyector se mantuvo a -5 °C con nitrógeno líquido presurizado durante 3,3 min para ventilar el exceso de disolvente, luego se llevó a 250 °C a 600 °C min^{-1} y se mantuvo a 250 °C durante 2 min. La separación se realizó en una columna VF-23 ms (30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm) y el eluato se analizó en un detector de masas cuadrupolo Agilent 5977 como se describe en la sección 2.9. El programa de temperatura comenzó a 45 °C y se llevó a 190 °C a 15 °C min^{-1} , luego a 240 °C a 30 °C min^{-1} y se mantuvo durante 2 min a 240 °C. El análisis de BITC (**2**), un importante producto hidrolítico primario, requirió solo la inyección de 1 μl de extracto utilizando una relación de división de 20:1 y una temperatura del inyector de 250 °C. Todas las demás condiciones permanecieron sin cambios.

2.11. Extracción y análisis de ácido benzoico

Se utilizaron diez ml de CH_2Cl_2 acidificado (HCl al 0,1%) para extraer el equivalente a 0,5 g de peso seco de maca en tubos de vidrio de 10 ml con tapas de rosca con revestimiento de PTFE. Las muestras se agitaron durante 30 s y luego se agitaron en un baño de ultrasonido de 40Hz durante 1 h a 30 °C. Los extractos se secaron a través de una columna de sulfato de sodio, se recogieron en viales de vidrio de 12 ml y se almacenaron bajo nitrógeno a -20 °C hasta su análisis. Para el análisis de GC, el ácido benzoico (**8**) se derivatizó con MSTFA como sigue: 2 ml de extracto de CH_2Cl_2 se secaron en un evaporador centrífugo (Concentrator Plus, Eppendorf) en modo de vacío alcohólico a 30 °C durante 20 min, se redisolviaron en 250 μl de CH_2Cl_2 , se transfirieron a un inserto de vial de GC de 250 μl y se secaron en el concentrador a 45 °C durante 15 min. Se añadió MSTFA (20 μl) y se calentó a 60 °C durante 30 min (Senger et al., 2005). Después de enfriar durante 10 min, se añadieron 80 μl de diclorometano. Se inyectó un μl de muestra en un GC-FID Agilent 7890 A, equipado con un

Columna DB-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm). La temperatura del inyector fue de 250 °C, *split* 10:1, flujo de gas 1 ml min⁻¹. El programa de temperatura comenzó a 50 °C durante 4 min, subió a 180 °C a 25 °C min⁻¹, luego a 250 °C a 10 °C min⁻¹ y finalmente a 280 °C a 30 °C min⁻¹ y se mantuvo a 280 °C durante 5 min.

2.12. Hidrólisis de ésteres de ácido benzoico

Se llevaron tres ml de extracto de maca en MeOH al 70% (de 4.5) a 50% MeOH, HCl 1 N (a los 3 ml de extracto se añadieron 800 μl de agua y 400 μl de HCl concentrado) y se calentó a 100 °C durante 1 h en un vial oscuro. Una vez que la mezcla se hubo enfriado, se agregaron 2 ml de diclorometano y se agitó con vórtex durante 30 s y luego se centrifugó a 100 x g durante 10 min. La fase orgánica se recogió, se secó con sulfato de sodio, se agitó durante 10 s, se centrifugó a 100 x g durante 10 min y se transfirieron 1,5 ml del sobrenadante a un vial de 2 ml y se concentró a 100 μl en un Concentrator Plus (Eppendorf) en modo alcohólico al vacío durante 20 min, y se transfirió a un inserto de vial de GC, se secó y procesó como en la sección anterior.

2.13. Análisis de amoníaco

Se tomaron 100 μl de extracto MeOH de maca al 70% (de la sección 2.5) para su derivatización con dietil etoximetilen malonato (DEEMM) adicionando 175 μl de *buffer* borato de sodio (1 M, pH 9.4), 75 μl de metanol y 3 μl de DEEMM. Las muestras se agitaron en baño de ultrasonido durante 45 min a 30 °C, se colocaron en un bloque de calentamiento durante 2 h a 70 °C, se centrifugaron a 20,000 × g durante 5 min y el sobrenadante se usó para el análisis. Se utilizó un sistema de bomba cuaternaria HPLC Agilent 1260 Infinity II con detector de arreglo de diodos, con un Merck LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) LiChroCART 250-4 RP-18 (250 mm × 4 mm, 5 μm). El flujo fue de 1 ml min⁻¹ y el calentador de columna se ajustó a 40 °C. Se inyectaron las muestras (10 μl) y se monitoreó la elución a 280 nm. El sistema disolvente constaba de acetonitrilo (solvente A) y *buffer* NaOAc 20 mM, pH 4,2 (solvente B). El gradiente de solvente fue de 2 min de 20 a 30 % A, mantener 3 min a 30 % A, 5 min de 30 % a 50 % A y mantener 2 min a 50 % (Gómez-Alonso et al., 2007; Redruello et al., 2013).

3.Resultados

3.1. Perfil en el tiempo de productos hidrolíticos volátiles (VOCs) de glucosinolatos

En un informe anterior (Esparza et al., 2015) se monitoreó la liberación de productos de hidrólisis de glucosinolatos volátiles durante el secado en horno utilizando un enfoque de acumulación de los metabolitos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) en el aire de cámaras cerradas en las que se llevaba a cabo el proceso de secado. Esto implicó el muestreo con fibras de microextracción en fase sólida (SPME) en condiciones estáticas (sin flujo) en el espacio de aire (headspace) sobre el tejido en secado. Estas condiciones permitieron resoluciones de tiempo de más de 1 h, que para el propósito de este estudio no eran satisfactorias. Debido a ello, se optó por un sistema dinámico de análisis. Este mantenía la técnica de muestreo SPME, relativamente robusta, pero se eliminaban las condiciones estáticas de muestreo y se optaba por una configuración de cámara de flujo con puertos de acceso con sondas de temperatura y humedad relativa junto con fibras SPME (ver Fig. 2, A y parte experimental). La cámara se colocó en una incubadora y se reguló el flujo de aire a través de cámara para garantizar la sustitución completa de un volumen de aire en la cámara cada 15 min. Bajo estas condiciones de temperatura y flujo de aire, el tiempo calculado para tener las microfibras de muestreo en equilibrio al 90 % fue de 15 min, lo que permitió una resolución adecuada y reproducible en el muestreo de VOCs para la primera hora después de la trituración de las raíces.

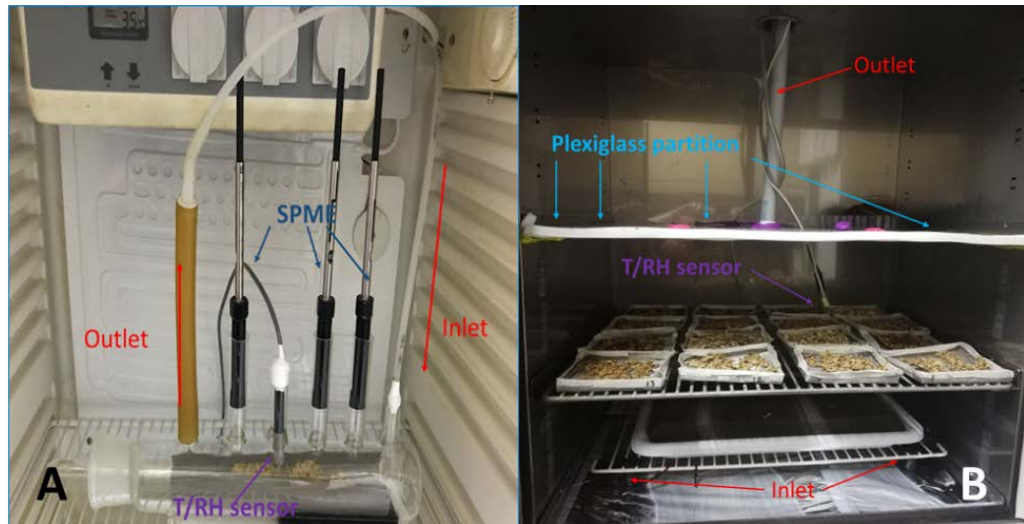


Figura 2. Sistemas utilizados para el monitoreo de metabolitos volátiles y no volátiles durante el secado de maca. **A:** Cámara de flujo para monitorear los VOCs del espacio de cabeza durante el proceso de secado. Contenía un puerto para entrada y salida de aire, un puerto para el sensor de temperatura/humedad y tres puertos de inserción para las fibras SPME. **B:** Horno modificado utilizado durante el proceso de secado. Contenía una chimenea de entrada y salida de aire, un puerto para el sensor de temperatura/humedad y 16 bandejas de malla de acero para las muestras.

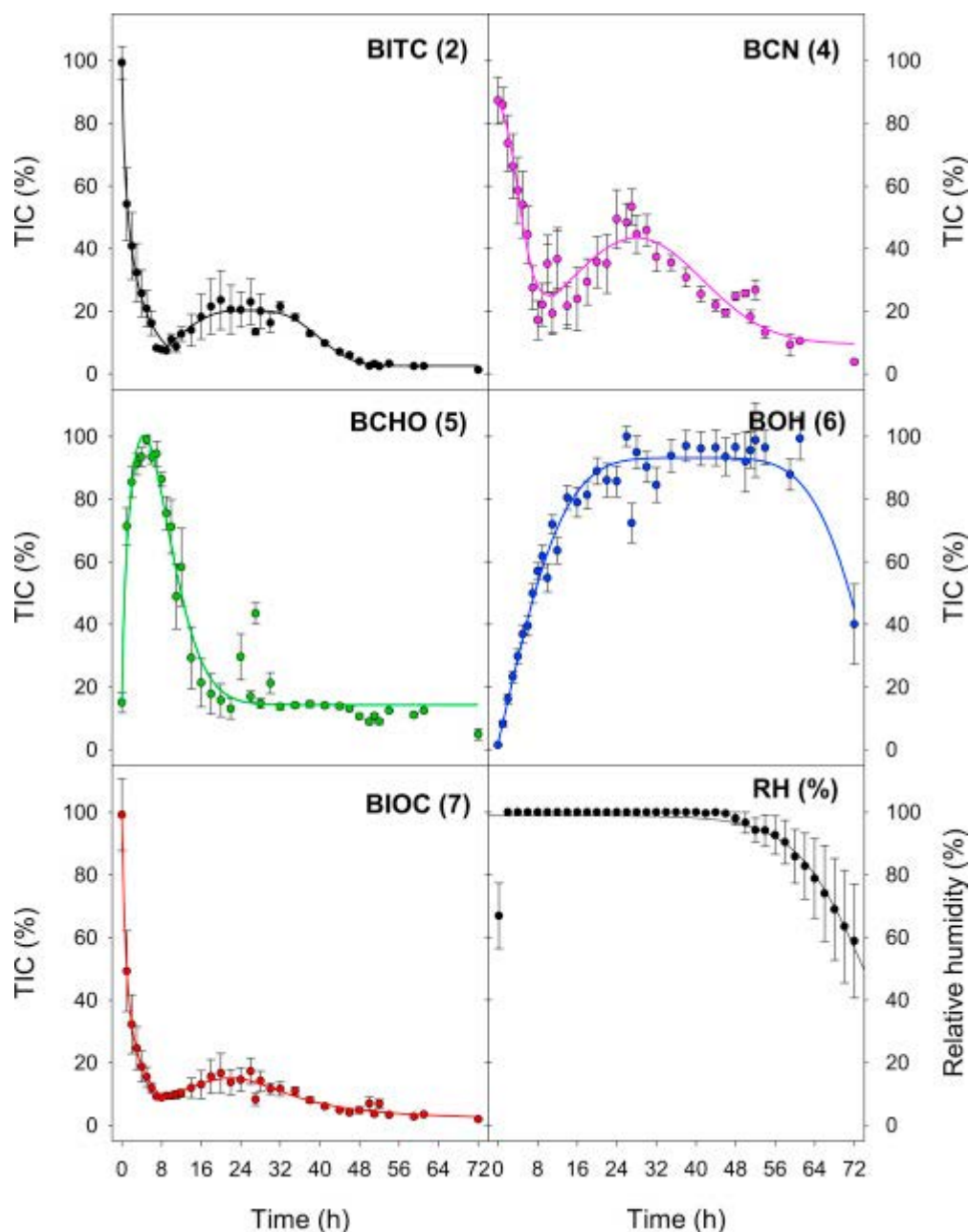


Figura 3. Evolución temporal de los principales VOCs de la hidrólisis de glucosinolatos medidos por SPME-GC-MS de espacio de cabeza. Los valores se expresan como porcentaje de la corriente total de iones máxima promedio (TIC) para cada compuesto. Los compuestos, de arriba a la izquierda son: bencilisotiocianato (BITC, **2**), bencilnitrilo (BCN, **4**), benzaldehído (BCHO, **5**), bencilalcohol (BOH, **6**), bencilisocianato (BIOC, **7**) y humedad relativa promedio (RH) dentro de la cámara ($N = 9$). Los valores pico de TIC ($\times 10^7$) para los compuestos fueron: 238,42 (**2**, 100%); 2,88 (**4**, 1,2%); 34,9 (**5**, 14,6%); 28,17 (**6**, 11,8%) y 3,75 (**7**, 1,6%). Los valores entre paréntesis después del número de compuesto indican la intensidad relativa del pico en relación con el pico de isotiocianato. RH = humedad relativa en el espacio libre de cabeza.

La figura 3 muestra, como era de esperarse, que los 3 principales productos detectados de la hidrólisis de bencil glucosinolato, el bencil isotiocianato (BITC, **2**), bencil nitrilo (BCN, **4**) y bencilisocianato (BIOC, **7**) muestran aumentos casi instantáneos desde 0 en la concentración del espacio de cabeza con caídas más lentas durante las siguientes 16 h a través de la conversión en intermediarios menos volátiles. El isotiocianato (**2**) es el producto hidrolítico más grande mientras que **7** y **4** representan aproximadamente el 3% de **2**, cada uno medido como corriente total de iones (TIC) en el detector de masas. También se puede observar que los tres compuestos muestran un segundo pico más pequeño 24 h después del inicio del proceso de secado. La interpretación más probable de esto es que el pico más grande muy temprano es el resultado del daño tisular durante la trituración de las raíces de maca para generar fragmentos más pequeños para el secado. El segundo pico, que muestra una cinética significativamente más lenta, se origina en la hidrólisis del glucosinolato debido a la destrucción del tejido durante el secado. Este proceso se extiende a lo largo de 72 h, luego de lo cual la humedad residual en el material alcanza entre 2 y 8 % (20–80 mg g⁻¹ peso seco).

El comportamiento de los otros dos VOCs observados, benzaldehído (BCHO, **5**) y bencil alcohol (BOH, **6**), es el que se puede esperar de los productos de conversión secundarios de la hidrólisis. Vale la pena señalar que mientras BCHO (**5**) muestra un pico estrecho a las 8 h, es detectable desde muy temprano y, después de alcanzar su pico, cae bruscamente a una cantidad menor, alrededor del 20% de su valor pico, y permanece en ese nivel hasta el final del período de secado. Por el contrario, BOH (**6**) tiene un pico mucho más amplio que se extiende de 16 a 56 h y cae a alrededor del 40 % de su valor máximo al final del ciclo de secado. La respuesta máxima del detector (como concentración total de iones) fue muy similar para ambos compuestos y ascendió al 14,6 % para el BCHO y al 12 % para el BOH de la respuesta máxima observada para el isotiocianato (BITC, **2**). Los perfiles de los VOCs detectados BITC, BCN, BCHO, BOH, BIOC (**2, 4, 5, 6, 7**) concuerdan con lo reportado para la hidrólisis de glucosinolatos (Halkier y Gershenzon, 2006; Vaughn y Berhow, 2005). Los perfiles de curso de tiempo de BCHO y BOH, señalan una secuencia de generación específica. El pulso relativamente estrecho de BCHO en la fase gaseosa es seguido de cerca por el aumento correspondiente de BOH, que luego permanece estable hasta que disminuye a medida que aumenta la desecación del tejido. Las cantidades de BOH en el espacio de cabeza sólo comienzan a

disminuir a medida que la humedad relativa en la cámara también comienza a disminuir, lo que indica claramente que el agua residual en los tejidos está llegando a su punto final.

3.2. La bencilamina es el principal producto de acumulación de la hidrólisis de glucosinolatos en raíces secas de maca

Para correlacionar las concentraciones de sustrato de glucosinolato con las de sus metabolitos hidrolíticos volátiles y semivolátiles en los tejidos durante el secado, se rediseñó la configuración de cámara de secado para permitir una mayor cantidad de tejido. Se modificó un horno de laboratorio de 70 l y se redujo su volumen efectivo a 35 l instalando una partición de plexiglás dentro de la cámara. El flujo de aire (70 l h^{-1}) ingresaba por la parte inferior del horno y el aire húmedo se eliminaba a través de una chimenea que conectaba el tabique de plexiglás con la salida de aire sobre el horno (Figura 2, B). El aire que ingresaba al horno pasaba a través de múltiples tubos de salida para garantizar un flujo de aire mayormente homogéneo desde la parte inferior hasta la chimenea de escape. Se procesaron un total de 640 g de raíces trituradas en 16 bandejas de malla de acero por experimento, el tiempo del proceso de secado de 72 h limitó la resolución a 9 puntos de muestra para estos experimentos. Las muestras de tejido se extrajeron directamente con solvente y se analizaron por GC-MS o HPLC como se describe en la parte Experimental.

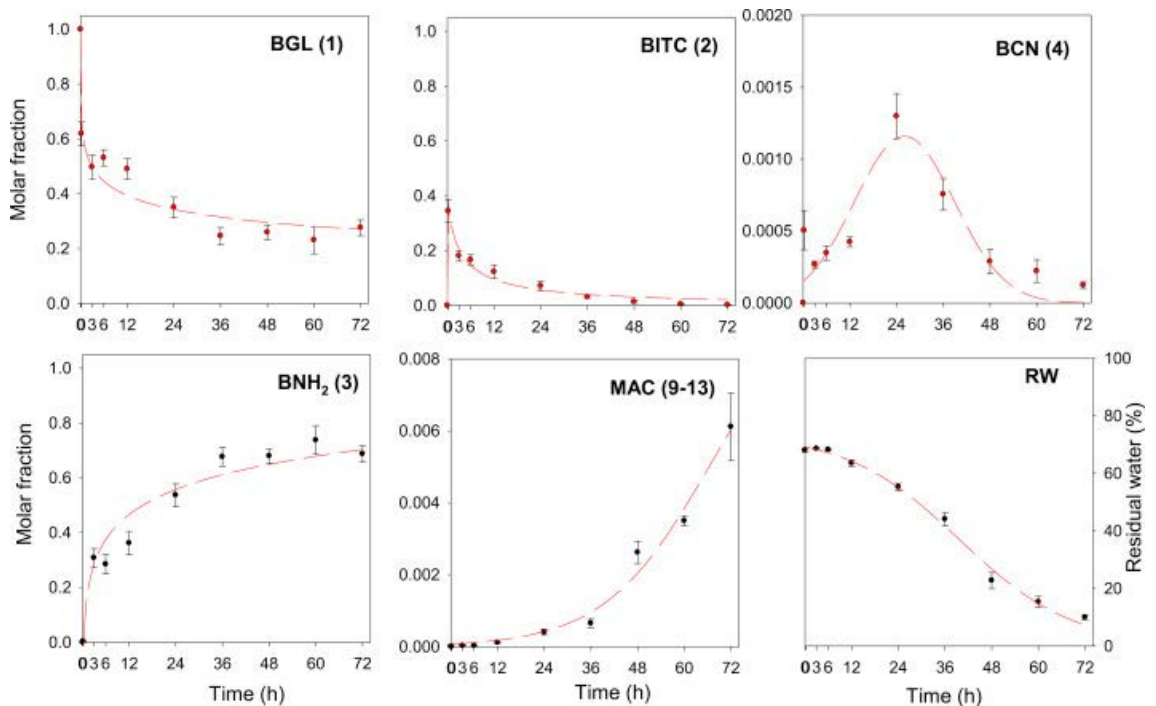


Figura 4. Concentraciones tisulares durante el secado en horno para bencilglucosinolato (BGL) y sus metabolitos. Se extrajo tejido seco de maca en solvente y se analizaron los niveles de bencilglucosinolato, sus productos hidrolíticos primarios (BITC, BCN) y dos productos que se acumulan en la harina, bencilamina (BNH₂) y macamidas (MAC). RW representa la humedad residual. Los patrones de producto hidrolítico y de acumulación final coinciden con los reportados previamente (Esparza et al., 2015), aunque para este estudio se empleó un período de secado de 72 h y una temperatura constante de 35 °C. Los valores se expresan en fracción molar de la concentración inicial de glucosinolatos, donde **1** = $36 \pm 5 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco. (N = 6). Los coeficientes de regresión no lineal para los compuestos fueron: $R^2 = 0,941$ (BGL, **1**), $R^2 = 0,971$ (BITC, **2**), $R^2 = 0,777$ (BCN, **4**), $R^2 = 0,955$ (BNH₂, **3**), $R^2 = 0,985$ (MAC, **9-13**) y $R^2 = 0,993$ (RW).

La figura 4 muestra el curso temporal de la degradación del glucosinolato (**1**) durante el secado en comparación con los de sus productos hidrolíticos primarios iniciales BITC (**2**) y BCN (**4**), el principal producto aminado, BNH₂ (**3**), y un grupo de productos de acumulación terminal, macamidas (**9-13**). Los resultados se presentan como fracción molar de la cantidad inicial de bencilglucosinolato (BGL, **1**) para ilustrar el flujo relativo a través de los intermediarios hasta los productos de acumulación final.

En los primeros minutos se puede observar una conversión muy rápida de aproximadamente 40% BGL (**1**) en BITC (**2**) como resultado de la fragmentación

del tejido realizada antes del proceso de secado. Una pequeña cantidad de glucosinolato (0,05%) se convierte en nitrilo (BCN, **4**) en estos primeros instantes, lo que demuestra la preferencia de la maca en estas condiciones por la formación de isotiocianatos frente a otros productos hidrolíticos primarios. Las cantidades de BCN (**4**) siguieron aumentando lentamente durante 24 horas, pero nunca superaron el 0,12 % de los valores iniciales de glucosinolato. El aumento de la bencilamina (**3**) refleja la disminución de BITC (**2**), con un aumento rápido durante la primera hora hasta aproximadamente el 30 % de la cantidad molar inicial de glucosinolato, seguido de un aumento lento hasta cerca del 70 % hacia el final del período de secado. El análisis de correlación apoya la secuencia metabólica **1** a **3** con un R_2 de $-0,92$ ($p < 0,05$, Fig. 5) para los patrones de caída de la concentración de bencilglucosinolato (**1**) y el aumento correspondiente de bencilamina (**3**). La bencilamina representa el mayor porcentaje molar de los productos finales de hidrólisis de glucosinolatos en la maca seca. La formación de macamida, por otro lado, avanza lentamente, aumentando abruptamente solo después de 36 h, pero alcanzando un valor final de solo 0.6% del contenido molar inicial de glucosinolato. La acumulación de macamidas muestra una correlación positiva baja ($R^2 = 0,673$, $p = 0,033$) con la de la amina (**3**) y parece más dependiente de la disponibilidad de ácidos grasos libres y del avance de la deshidratación tisular para su formación (Esparza et al., 2015). Nuestros resultados muestran una clara correlación entre la formación de macamidas y la deshidratación del tejido ($R^2 = -0,923$, $p < 0,0005$), condición que puede promover la condensación de ácidos grasos con bencilamina.

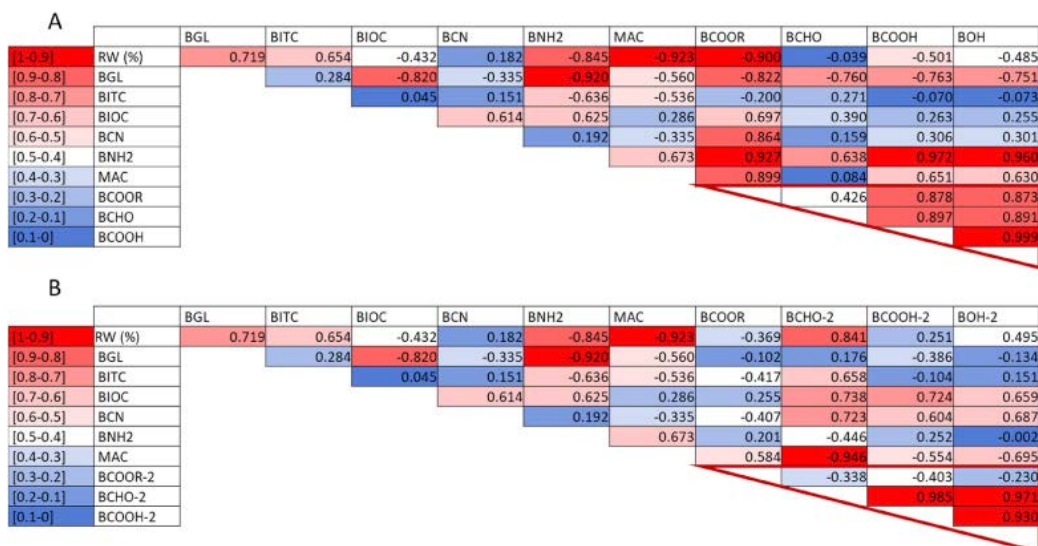


Figura 5. Valores de correlación de Pearson para productos hidrolíticos de glucosinolatos. El panel A muestra la correlación de metabolitos para la etapa temprana de secado, donde las reacciones son causadas por daño directo al tejido por trituración. El panel B muestra la correlación entre los intermediarios como resultado de la deshidratación del tejido en etapa tardía. BCOOR-2, BCHO-2 y BCOOH-2 que se muestran en el panel B corresponden a los puntos de datos en la Fig. 5 que se muestran como parte de la línea continua roja, mientras que BCOOR (8a), BCHO (5) y BCOOH (8) en el panel A corresponden a la etapa inicial en la figura que se muestra en líneas negras continuas.

3.3 La desaminación es el punto de inflexión para la formación de macamidas o de bencenoides.

Los perfiles de acumulación de los principales productos bencenoides desaminados de la hidrólisis de glucosinolatos, benzaldehído (BCHO, 5), alcohol bencílico (BOH, 6) y ácido benzoico (BCOOH, 8), se muestran en la Fig. 6. Estas mediciones permitieron distinguir entre un rápido proceso hidrolítico generado por la trituración mecánica del tejido de maca para reducir su tamaño para el secado y un segundo proceso, más lento, que surge de la deshidratación del tejido. Se ha intentado separar estos dos perfiles mediante regresión no lineal. Como se puede observar, los niveles de estos metabolitos aumentan rápidamente justo después de la trituración (líneas negras sólidas). El producto inicial de esta secuencia es el aldehído (5) que alcanza su punto máximo a las 3 h, seguido por el alcohol (6) y el ácido (8) a las 6 h. Los valores máximos de los tres compuestos son similares y representan entre el 0,2 y el 0,3 % de las cantidades molares iniciales de glucosinolatos. El segundo pico (líneas rojas

continuas) surge de la deshidratación del tejido y alcanza un máximo a las 36 h para los tres compuestos, después de lo cual los niveles caen rápidamente. Los valores máximos de esta segunda etapa muestran fuertes diferencias para cada compuesto. Mientras que el **5** alcanza un pico de no más de 0,12% de glucosinolato, el **6** y el **8** alcanzan niveles de 0,7 y 1,2% respectivamente. Más significativas son las diferencias en las proporciones entre los valores máximos de las etapas temprana (A) y tardía (B). Mientras que para benzaldehído (**5**) la relación A/B es 1,5, es 0,5 para bencilalcohol (**6**) y 0,25 para ácido benzoico (**8**). Esto concuerda con una secuencia biogénica que comienza con **5** como producto de desaminación inicial. El panel inferior derecho de la figura 6 muestra el perfil de los ésteres de ácido benzoico (BCOOR, **8a**) con una acumulación temprana rápida y una reducción progresiva de velocidad a medida que el tejido se seca de manera similar a la bencilamina (**3**) descrita en la sección anterior. Al igual que con **3**, los ésteres benzoicos (**8a**) muestran el perfil de un producto de acumulación final, en este caso como productos potenciales de desintoxicación del ácido benzoico (**8**). Las cantidades molares máximas observadas en nuestro ensayo fueron alrededor del 2,3 % de los valores iniciales de glucosinolatos, 27 veces menos que los valores de amina al final del período de secado.



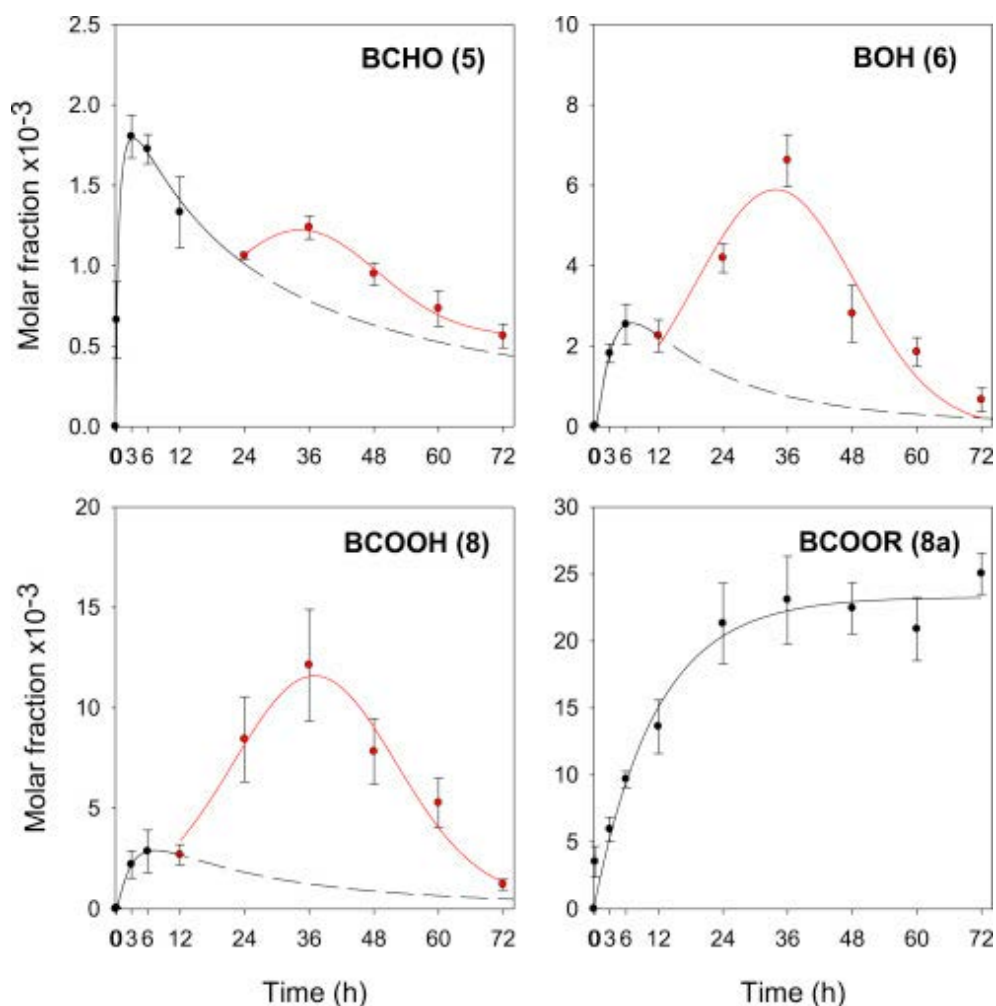


Figura 6. Perfiles de curso de tiempo para productos bencenoides desaminados transitorios y finales en el secado de tejidos de maca. Los perfiles cinéticos muestran dos etapas, una cinética temprana “rápida” (líneas negras continuas) que tiene lugar en las 12 h iniciales, correspondiente al daño a los tejidos producido por la trituración para reducir el tamaño para el secado y una segunda etapa “lenta” (líneas rojas continuas) que muestra la deshidratación de los tejidos en la parte tardía del proceso de secado. Los puntos de datos correspondientes a las fases inicial y tardía se han sometido a regresión no lineal por separado. Los coeficientes de regresión no lineal para los metabolitos fueron para BCHO (5): $R^2 = 0,9962$ (fase temprana), $R^2 = 0,9880$ (fase tardía), para BOH (6): $R^2 = 0,9999$ (temprana), $R^2 = 0,9522$ (fase tardía), BCOOH (8): $R^2 = 0,9999$ (temprana), $R^2 = 0,9526$ (tardía), BCOOR (8a): $R^2 = 0,9677$.

Aunque representan una fracción muy pequeña de la hidrólisis total de glucosinolato, los bencenoides desaminados combinados todavía representan más del doble de la cantidad de macamidas formadas durante el secado.

Además de esto, el ácido benzoico y sus ésteres son preservantes de alimentos controlados y la presencia de niveles altos de estos compuestos en la harina de maca llaman la atención de las autoridades reguladoras. A partir de las secuencias de perfil observadas, la desaminación de **3** parece ser la fuente de benzaldehído (**5**) y de la secuencia redox que conduce a **6** y **8** con eventual acumulación de ésteres benzoicos (**8a**).

Se exploró la pérdida de nitrógeno en el proceso monitoreando la concentración de iones de amonio durante el secado del tejido. Los resultados (Fig. 7) mostraron un rápido aumento durante las primeras 24 h seguido de una ligera caída hacia el final del proceso de secado. El nivel de iones de amonio en los tejidos alcanzó su concentración máxima entre las 24 y 36 h de tiempo de secado, coincidiendo con el pico bencenoide. Con valores máximos de alrededor de $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco, el amonio representa el 100 % de la cantidad molar de nitrógeno de bencilamina, un exceso considerable sobre el 3 % estimado de bencenoides que en realidad habría surgido de la desaminación de productos hidrolíticos de glucosinolato en nuestras condiciones experimentales. Por esta razón se debe tener en cuenta que la liberación de amonio podría provenir de otras fuentes nitrogenadas durante el secado.

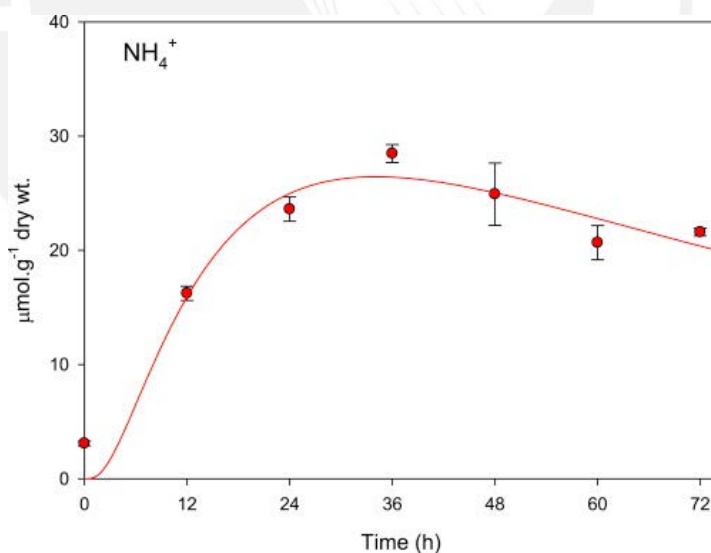


Figura 7. Evolución temporal de la concentración de ion amonio en tejidos de maca durante el secado. La desaminación de bencilamina y aminoácidos por aminooxidasas son fuentes potenciales de amoníaco en nuestras condiciones de secado corto (72 h). Los valores máximos de NH_4^+ son $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco. La cantidad total de bencenoides desaminados representa solo $0,75 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco indicando otras fuentes importantes de amonio en el proceso. Curva ajustada por regresión no lineal ($R^2 = 0,9472$).

4. Discusión

4.1. La reserva de bencilamina surge de la hidrólisis de isotiocianato mientras los tejidos aún se encuentran en una etapa hidratada.

La figura 8 resume un esquema metabólico propuesto para el proceso de secado basado en los hallazgos presentados en este reporte. Este esquema ha sido dividido en pasos, denominados de la A a la F, que agrupan reacciones metabólicas que tienen lugar en diferentes etapas de hidratación y niveles de oxidación de los tejidos.

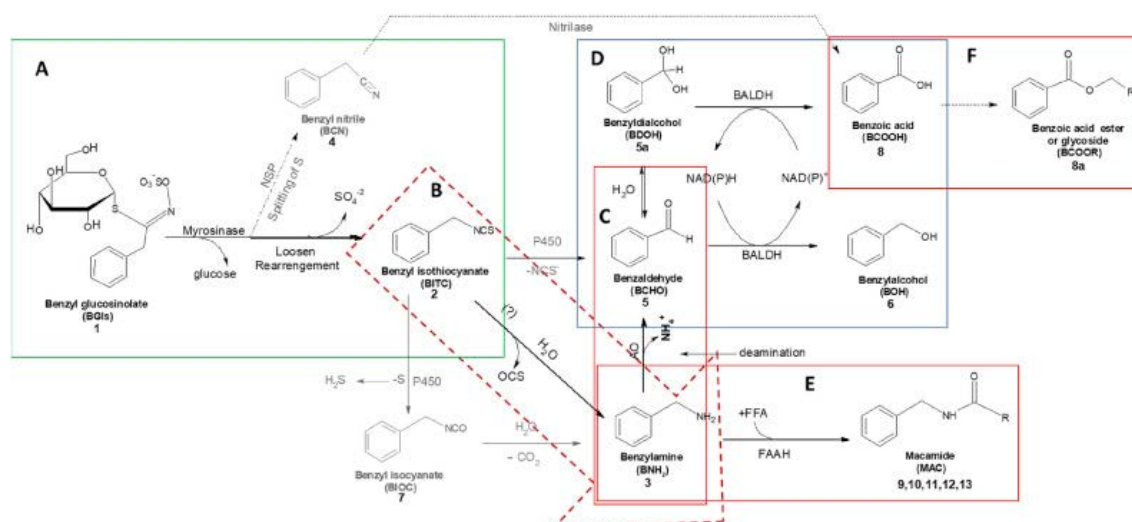


Figura 8. Esquema propuesto para las reacciones que tienen lugar durante el secado de la maca. La secuencia se basa en los principales metabolitos hidrolíticos observados durante el proceso de secado. El paso A describe las reacciones que generan los productos de hidrólisis iniciales e incluyen BITC (2), BCN (4) y BIOC (7). El paso B es la formación de BNH₂ (3), el principal producto de acumulación, a partir de BITC (2). El Paso C describe la desaminación de BNH₂ (3) para generar varios bencenoides desaminados. El paso D corresponde a las reacciones de desproporción que conducen a mezclas de BCHO (5), BOH (6) y BCOOH (8) por acción de una aldehído-deshidrogenasa. El paso E es la condensación de BNH₂ (3) con ácidos grasos libres para producir macamidas (MAC 9–13) y el paso F corresponde a la esterificación o glicosilación de BCOOH (8) como mecanismo de desintoxicación. Los números corresponden a los de la Fig. 1. Las líneas oscuras muestran reacciones favorecidas según nuestros resultados. Los compuestos en gris claro son productos transitorios menores.

Los pasos A y B, como se mostró en la sección 3.2, muestran una fuerte evidencia de una secuencia metabólica BGL (1)-BITC (2)-BNH2 (3) para la hidrólisis de glucosinolatos durante el secado. Esta observación coincide con reportes anteriores sobre el mecanismo de degradación térmica de glucosinolatos (De Nicola et al., 2012) (figura 9). La hidrólisis térmica de bencilisotiocianato (2) en solución acuosa puede tener lugar mediante el ataque de una molécula de agua que incorpora un OH en el carbono electrofílico central del isotiocianato para formar un ácido O-benzoil-carbamotiónico con liberación de sulfuro de carbono para formar bencilamina (3) (Figura S2, anexos). Aunque el mecanismo, como se describe, sugiere una reacción espontánea con una molécula de agua, de ninguna manera se descarta la participación de una enzima, bajo condiciones particulares, con residuos del sitio activo que generan el nucleófilo OH⁻ que facilite este mecanismo. Esta reacción es rápida y tiene lugar principalmente durante las horas iniciales del proceso de secado, cuando los tejidos aún están muy hidratados. Cabe destacar que la bencilamina (3) es el principal producto observado en la maca. Hay pocos informes sobre la acumulación de aminas libres parecidas a glucosinolatos a este nivel (Agerbirk y Olsen, 2012). Blážević et al. (2020) informaron recientemente de tal ocurrencia, pero en menores proporciones, a través de la conjugación de isotiocianato de indol-3-ilmetilo con glutatión y la posterior hidrólisis para formar indol-3-ilmetilamina.

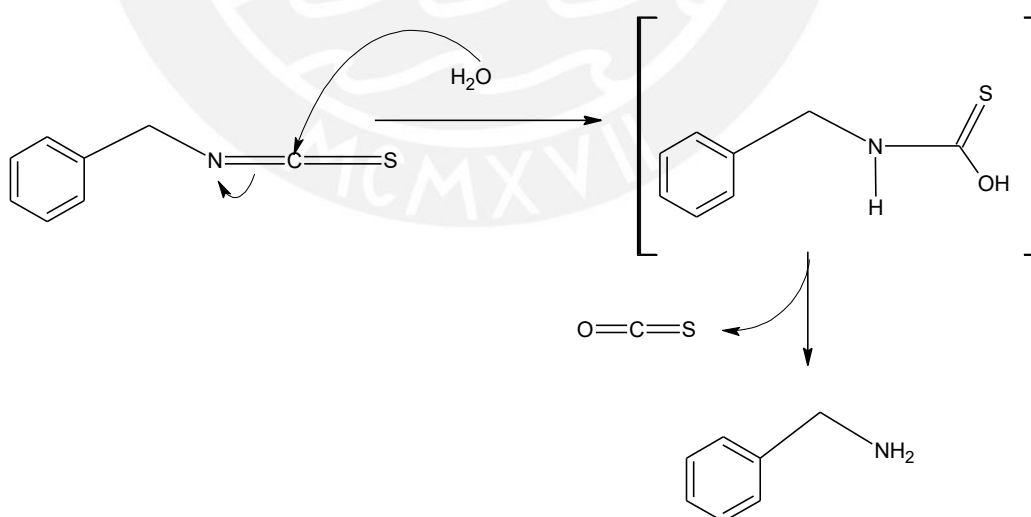


Figura 9. Mecanismo de hidrólisis térmica de bencilisotiocianato para formar bencilamina. En este caso, un átomo de oxígeno del agua se incorpora al carbono central del isotiocianato para formar un ácido O-bencilcarbamotiónico, que libera sulfuro de carbono y bencilamina (adaptado de De Nicola et al., 2013).

Después de 24 h, la tasa de acumulación desciende y la concentración de BNH₂ (3) en los tejidos aumenta muy lentamente debido a las tasas limitadas de hidrólisis del isotiocianato (2) en un ambiente ahora más seco. Una vez que se forma la amina, parece relativamente estable y se acumula en condiciones cada vez más deshidratadas. Las pérdidas limitadas del conjunto de aminas están mediadas por dos reacciones en competencia. Una es la desaminación a benzaldehído (5) (paso C, en la figura 8) a través de la acción de aminooxidasas presentes en el tejido y seguida de una reacción de desproporción (paso D) como se explica en la siguiente sección para formar el correspondiente alcohol (6) o ácido carboxílico (8). La reacción alternativa, el paso E, es la condensación de la amina (3) con ácidos grasos libres que surgen de la hidrólisis lenta de los triglicéridos almacenados y los lípidos de membrana para producir amidas (9–13). Esta reacción parece verse favorecida por la deshidratación del tejido, como se explica por la cinética de acumulación lenta observada para las macamidas. Durante las fases iniciales del secado, cuando la hidratación de los tejidos es alta y la concentración de ácidos grasos libres aún es baja, es cuando se pueden observar los picos de los bencenoides desaminados (BCHO, BOH, BCOOH). A medida que desciende la humedad residual en los tejidos, aumenta la condensación con ácidos grasos para formar amidas ($R^2 = 0,92$) y también cobra importancia la formación de ésteres y glucósidos de BCOOH ($R^2 = 0,9$) (paso F). Estas reacciones de condensación parecen verse favorecidas en presencia de baja humedad residual en los tejidos.

4.2. ¿Los bencenoides de maca son generados por una aldehído-deshidrogenasa que actúa en un patrón de reacción bio-Canizzaro?

Como se señaló en la sección 3.3, las concentraciones máximas de bencenoides desaminados muestran valores secuencialmente más altos (en fracción molar del glucosinolato inicial); 0,12% (BCHO, 5), 0,7% (BOH, 6), 1,2% (BCOOH, 8) y 2,1% (BCOOR, 8a). Los tres primeros son intermediarios transitorios, con un pico a las 36 h, mientras que los ésteres benzoicos (8a) se acumulan durante el secado como producto final. Los conjugados y los ésteres son productos de desintoxicación comunes en las vacuolas de dicotiledóneas (Matile, 1990). Los informes publicados indican que el ácido benzoico se elimina rápidamente a través de estos procedimientos en las plantas (Chrikishvili et al., 2006). La liberación de ácido benzoico del catabolismo de glucosinolatos durante el

secado de tejidos muy probablemente desencadena reacciones que conducen a la formación de estos restos y este proceso puede proporcionar el “tirón” metabólico para la oxidación de BCHO en BCOOH. Por otro lado, las relaciones de proporción temporal y molar entre BCHO, BOH y BCOOH sugieren un proceso interrelacionado que podría explicarse invocando una reacción asimétrica de tipo Canizzaro donde el aldehído es el sustrato y el alcohol y el ácido son productos. El análisis de correlación (fig. 5) muestra valores elevados entre BCHO y BCOOH ($R^2 = 0,985$, $p < 0,05$) y entre BCHO y BOH ($R^2 = 0,971$, $p < 0,05$). Este proceso se ha propuesto para varias aldehído deshidrogenasas procarióticas y eucarióticas (Wuensch et al., 2013) y proporciona una explicación adecuada para el comportamiento observado, ya que requiere solo una enzima, en lugar de necesitar una aldehído oxidasa adicional (Ibdah et al., 2009) y siendo esencialmente redox neutral (Fig. 10). Según este modelo, la enzima cataliza dos semirreacciones. El aldehído en solución acuosa está en equilibrio con su forma diol (**5a**) y proporciona sustrato para ambos. La semirreacción oxidativa conduce del diol (**5a**) al ácido benzoico (**8**) y la semirreacción reductora convierte el benzaldehído (**5**) en bencilalcohol (**6**). Esta secuencia, como se describe, debería conducir a la acumulación de BCOOH (**8**) y BOH (**6**), sin embargo, ninguno de los dos es un producto de acumulación final en nuestros experimentos. La eliminación del ácido benzoico se realiza mediante la conversión en ésteres (**8a**) (Fig. 8 paso F), proceso que explica por qué no se acumula. La falta de acumulación de (**6**), que aparece como un producto transitorio que alcanza su punto máximo en el tejido a las 36 h, requiere una explicación más elaborada. Dos posibilidades podrían explicar esto, la concentración de BOH (**6**) en la fase gaseosa, como se observa usando SPME-GC-MS (Fig. 3) comienza a alcanzar su punto máximo solo a las 8 h alcanzando un valor de señal 14% del isotiocianato (**2**) y permanece en valores máximos durante casi todo el proceso de secado. Esto es en condiciones de flujo de aire constante a través de la cámara que elimina constantemente el alcohol de la fase gaseosa. El benzaldehído (BCHO, **5**) alcanza su punto máximo muy temprano en la fase gaseosa, a las 8 h, con valores de señal de aproximadamente el 12 % del pico de isotiocianato, y cae rápidamente de modo que a las 24 h los niveles están cerca de solo el 2 % del pico de señal de isotiocianato. y permanece así hasta el final del proceso. Especulamos que la conversión de BCHO en BOH, como se muestra en la Fig. 10, da como resultado la eliminación de este producto del tejido a través de la evaporación y el transporte de gas, como se muestra en la cinética de VOC. Los puntos de ebullición de 178 °C (**5**), 205 °C (**6**) y 250 °C

(8) sugieren el potencial para la eliminación de la fase gaseosa de (5) y (6), pero (5) también se procesa enzimáticamente en alcohol y ácido, lo que también explica su aparición transitoria como VOC. Un segundo factor que podría explicar la eliminación de BOH es la esterificación con BCOOH u otro ácido libre de cadena corta. Esto produciría benzoato de bencilo, un producto cuya detección resultó inconsistente en estos experimentos, o acetato de bencilo, que también se ha observado con poca frecuencia en los análisis de las muestras, lo que da más peso a la explicación de la eliminación de la fase gaseosa.

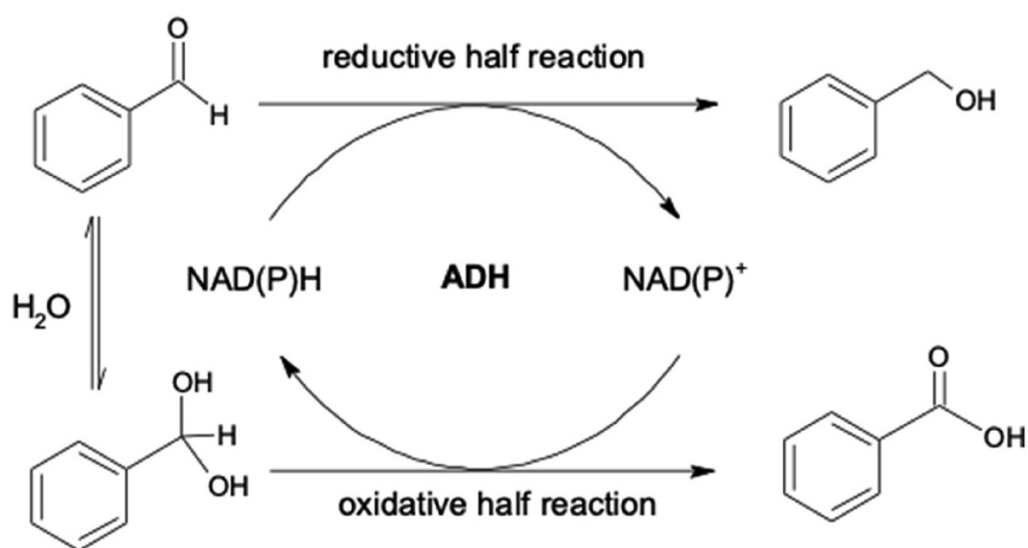


Figura 10. Esquema de reacción para la formación de BOH (6) y BCOOH (8) a partir de benzaldehído reactivo mediante una reacción tipo Cannizzaro, catalizada por una benzaldehído-deshidrogenasa (basado en Wuensch et al., 2013). El esquema propuesto requeriría solo una actividad enzimática para las semirreacciones oxidativa y reductora.

5. CONCLUSIONES

La bioquímica del secado postcosecha tradicional de raíces de maca es un proceso lento y complejo, que toma entre 6 y 8 semanas hasta completarse. En este estudio se buscó generar condiciones que permitieran evaluar, bajo condiciones de laboratorio, la evolución de los distintos productos metabólicos intermediarios del proceso, incluyendo un sistema con buena resolución temporal para una cuantificación relativa de los subproductos volátiles que pudiera proporcionar información clave, y hasta ahora ausente en la literatura, del catabolismo de glucosinolatos durante un procesamiento común en las culturas humanas como lo es el secado de órganos vegetales para su consumo. Para ello se empleó el secado en horno a temperatura moderada (35 °C) durante 72 h, bajo un flujo de aire, lo cual permitía bajo condiciones de equilibrio parcial monitorear intermediarios volátiles que pasan a la fase de gas. El seguimiento del perfil de los metabolitos hidrolíticos en base a la fracción molar del glucosinolato inicial nos permitió dar cuenta del 99 % de todos los remanentes bencilados presentes al final del proceso de secado. Los resultados muestran claramente que el principal producto de acumulación de bencilglucosinolato después del secado del tejido es bencilamina, la cual representa más del 94 % del sustrato hidrolizado. En el tejido deshidratado la amina es muy estable y otros productos derivados de su metabolismo, como las macámidas o los bencenoides desaminados, representan menos del 5% del material de partida. Los resultados observados permiten especular que la velocidad de deshidratación modula el grado de conversión de las bencilaminas en otros productos y, más relevante aún, si estos se condensarán con ácidos grasos para formar macámidas o si serán desaminados y se acumulan como ésteres de ácido benzoico. Se ha especulado anteriormente (Esparza et al., 2015) que la formación de macámidas podría optimizarse modulando la relación molar de amina a ácido graso, que suele ser de 10:1. Este estudio sugiere, más bien, que el factor determinante es la tasa de deshidratación. La formación de amida parece verse favorecida cuando se reduce significativamente la hidratación del tejido. Una tasa lenta de deshidratación, con daño tisular, favorece la desaminación de la bencilamina y la formación de fracciones bencenoides de aldehído, alcohol y ácido a través de la acción de aminooxidasas y una aldehído-deshidrogenasa que cataliza una desproporción en una reacción similar a la de Canizzaro. Las condiciones redox y de hidratación prevalecientes en el tejido favorecerán, entonces, la

acumulación de bencilalcohol y ácido benzoico. La esterificación del ácido proporciona un tirón metabólico en su dirección mientras que el bencilalcohol pasa a la fase gaseosa y se elimina en gran parte, tanto en condiciones de horno como de campo.



6. Bibliografía

- Agerbirk, N., Olsen, C.E., 2012. Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* 77, 16–45. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.005>.
- Blăzević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N., 2020. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis, and metabolism in plants. *Phytochemistry* 169, 112100. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>.
- Brown, P.D., Tokuhsa, J.G., Reichelt, M., Gershenzon, J., 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62, 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00549-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00549-6).
- Chen, J.J., Zhao, Q.S., Liu, Y.L., Gong, P.F., Cao, L., Wang, X.D., Zhao, B., 2017. Macamides present in the commercial maca (*Lepidium meyenii*) products and the macamide biosynthesis affected by postharvest conditions. *Int. J. Food Prop.* 20, 3112–3123. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1274905>.
- Chrikishvili, D., Sadunishvili, T., Zaalishvili, G., 2006. Benzoic acid transformation via conjugation with peptides and final fate of conjugates in higher plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 390–399. <http://doi:10.1016/j.ecoenv.2005.04.009>.
- De Nicola, G.R., Montaut, S., Rollin, P., Nyegue, M., Menut, C., Iori, R., Tatibouët, A., 2012. Stability of benzylic-type isothiocyanates in hydrodistillation-mimicking conditions. *J. Agric. Food Chem.* 61, 137–142. <https://doi.org/10.1021/jf3041534>.
- Esparza, E., Hadzich, A., Kofer, W., Mithöfer, A., Cosio, E.G., 2015. Bioactive Maca (*Lepidium meyenii*) alkaloids are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry* 116, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.030>.
- Fechner, J., Kaufmann, M., Herz, C., Eisenschmidt, D., Lamy, E., Kroh, L.W., Hanschen, F. S., 2018. The major glucosinolate hydrolysis product in rocket

(*Eruca sativa* L.), sativin, is 1,3-thiazepane-2-thione: elucidation of structure, bioactivity, and stability compared to other rocket isothiocyanates. *Food Chem.* 261, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.023>.

Ganzerá, M., Zhao, J., Muhammad, I., Khan, I.A., 2002. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 988–991. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.988>.

Gimsing, A.L., Kirkegaard, J.A., 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Rev.* 8, 299–310. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9105-5>.

Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 608–613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>.

Halkier, B.A., Gershenzon, J., 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>.

Ibdah, M., Chen, Y.T., Wilkerson, C.G., Pichersky, E., 2009. An aldehyde oxidase in developing seeds of *Arabidopsis* converts benzaldehyde to benzoic acid. *Plant Physiol.* 150, 416–423. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135848>.

Jeschke, V., Gershenzon, J., Vassao, D.G., 2016. Insect detoxification of glucosinolates and their hydrolysis products. *Adv. Bot. Res.* 80, 199–245. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.003>.

McCollom, M.M., Villinski, J.R., McPhail, K.L., Craker, L.E., Gafner, S., 2005. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochem. Anal.* 16, 463–469. <https://doi.org/10.1002/pca.871>.

Matile, P., 1990. The toxic compartment of plant cells. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, pp. 557–566. https://doi:10.1007/978-94-009-2103-0_84.

Møldrup, M.E., Geu-Flores, F., Olsen, C.E., Halkier, B.A., 2011. Modulation of sulfur metabolism enables efficient glucosinolate engineering. *BMC Biotechnol.* 11, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-12>.

Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J.K., Bockelmann, W., Heller, K.J., Schwarz, K., 2016. Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chem.* 190, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.012>.

Platz, S., Kühn, C., Schiess, S., Schreiner, M., Kemper, M., Pivovarova, O., Pfeiffer, A.F. H., Rohn, S., 2015. Bioavailability and metabolism of benzyl glucosinolate in humans consuming Indian cress (*Tropaeolum majus* L.). *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 652–660. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500633>.

Rabie, M.A., Siliha, H., el-Saidy, S., el-Badawy, A.A., Malcata, F.X., 2011. Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chem.* 129, 1778–1782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.10600>.

Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, M.C., Fernández, M., Alvarez, M.A., 2013. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chem.* 139, 1029–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>.

Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Göbel, C., Lerchl, J., Pohnert, G., Feussner, I., 2005. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem.* 280, 7588–7596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411738200>.

Simons, S.S., Johnson, D.F., 1978. Reaction of *o*-phthalaldehyde and thiols with primary amines: fluorescence properties of 1-alkyl(and aryl)thio-2-alkylisoindoles. *Anal. Biochem.* 90, 705–725. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90163-X12100](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90163-X12100).

Sørensen, J.C., Frandsen, H.B., Jensen, S.K., Kristensen, N.B., Sørensen, S., Sørensen, H., 2016. Bioavailability and in vivo metabolism of intact glucosinolates. *Journal of Functional Foods* 24, 450–460.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.023>.

Traka, M.H., 2016. Health benefits of glucosinolates. *Adv. Bot. Res.* 80, 247–279. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.004>.

Tang, C.S., Bhothipaksa, K., Frank, H.A., 1972. Bacterial degradation of benzyl isothiocyanate. *Appl. Microbiol.* 23, 1145–1148.

Vaughn, S., Berhow, M., 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind. Crop. Prod.* 21, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.03.004>.

Wittstock, U., Kurzbach, E., Steiner, A.M., Stauber, E.J., 2016. Glucosinolate breakdown. *Adv. Bot. Res.* 80, 125–169.

<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.006>.

Wuensch, C., Lechner, H., Glueck, S.M., Zangger, K., Hall, M., Faber, K., 2013. Asymmetric biocatalytic Cannizzaro-type reaction. *ChemCatChem* 5, 1744–1748. <https://doi.org/10.1002/cctc.201300028>.

Yábar, E., Pedreschi, R., Chirinos, R., Campos, D., 2011. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chem.* 127, 1576–1583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.021>.

Zhang, S.Z., Yang, F., Shao, J.L., Pu, H.M., Ruan, Z.Y., Yang, W.L., Li, H., 2020. The metabolic formation profiles of macamides accompanied by the conversion of glucosinolates in maca (*Lepidium meyenii*) during natural air drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* 55, 2428–2440.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.14493>.

7. ANEXOS
Material Suplementario

Tabla S1. Gradiente de solventes de HPLC para la separación de macamidas

t (min)	% H₂O	% ACN	% MeOH
0	33	65	2
2.4	33	65	2
3.6	14	85	1
15.6	0	100	0
21	0	100	0
24	33	65	2
27	33	65	2

Tabla S2. Condiciones para las señales SIM positivas y negativas en APCI-MS

Positivo

Tiempo (min)	Grupo	ión SIM m/z	Fragmentor V	Gananancia EMV
0	1	382	200	1
		384	200	1
		386	200	1
8	2	368	200	1
		398	200	1
9.7	3	370	200	1
		400	200	1
11.7	4	346	200	1
		372	200	1
		396	200	1
15	5	374	200	1

Negativo

Tiempo (min)	Grupo	ión SIM m/z	Fragmentor V	Gananancia EMV
0	1	291	200	1
		293	200	
		295	200	
7	2	277	200	1

9	3	279	200	1
10.5	4	255	200	1
		281	200	
13	5	283	200	1



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

Glucosinolate catabolism during postharvest drying determines the ratio of bioactive macamides to deaminated benzenoids in *Lepidium meyenii* (maca) root flour

Eliana Esparza, Winnie Yi, Fabian Limonchi, Eric G. Cosio*

Chemistry Section and Institute for the Sciences of Nature, Earth and Energy (INTE-PUCP), Pontifical Catholic University of Peru, Av. Universitaria, 1801, Lima, 15088, Peru

ARTICLE INFO

Keywords:

Lepidium meyenii
Brassicaceae
Maca
Benzenoid metabolism
Glucosinolate hydrolysis
Postharvest processing
Benzyl alkamides
Aldehyde dehydrogenase
Amine oxidases

ABSTRACT

Postharvest processing of maca (*Lepidium meyenii* Walp., Brassicaceae), a traditional high-altitude Andean root crop, involves slow field drying prior to milling into flour. The progressive tissue dehydration and release of hydrolytic enzymes and substrates from cellular compartments results in the slow accumulation of free mono-saccharides, fatty acids and amino acids. A more complex, and faster, kinetic profile is that of glucosinolate breakdown. A number of reactive transient and stable accumulation products are generated during drying, some of which have noteworthy bioactive properties. Among these are macamides, inhibitors of endocannabinoid neurotransmitter degradation in mammalian nervous systems. They result from the condensation of benzyl amine, a glucosinolate hydrolysis product, with free fatty acids released from lipid hydrolysis. Recent research has focused on developing drying processes under controlled conditions that can modulate the biochemistry of glucosinolate hydrolysis to optimize the content of bioactive compounds in the root flour. Low temperature (35 °C) oven-drying of shredded maca roots under controlled air flow generates benzyl amine as primary accumulation product, accounting for up to 94% of hydrolyzed glucosinolate in the flour. Kinetic evidence suggests that both deaminated benzenoids and macamides are allocated from the benzylamine pool through amine oxidase activity or condensation with free fatty acids, accounting for the remaining hydrolyzed glucosinolate (<5%). These activities determine the allocation to either one of these pathways. Later stages of dehydration result in shifts in the molar ratios of deaminated benzenoids, the accumulation of benzoic acid esters and benzyl alcohol. We propose that these are the result of changes in the rates of the reductive and oxidative half-reactions of endogenous aldehyde dehydrogenases. It is the ratio of benzylamine deamination to amide formation that determines the eventual yields of macamides in relation to benzenoids and their esters in maca flour.

1. Introduction

Postharvest processing of many cruciferous crop plants involves damage to tissues through maceration, fermentation or drying (Rabie et al., 2011; Palani et al., 2016). Glucosinolate breakdown metabolites are relevant to the properties and final use given by humans to these products (Traka, 2016). Glucosinolate metabolism has received considerable attention in recent years as a plant defense response against herbivores, for its impact on the human digestive tract and in the

study of glucosinolate recycling in plant cells (Fechner et al., 2018; Gimsing and Kirkegaard, 2009; Wittstock et al., 2016; Platz et al., 2015).

Maca (*Lepidium meyenii* Walp., Brassicaceae), is an ancestral Andean root crop which is well adapted to the harsh high-altitude environment, above 4000 m, where it is usually planted. It has been the object of numerous studies related to its bioactive components with beneficial properties on fertility, cognition and energy management, among others (Yábar et al., 2011). Its traditional postharvest processing involves drying the roots in open fields over a period of up to 12 weeks during

Abbreviations: BGL (1), benzyl glucosinolate, glucotropaeolin; BITC (2), benzyl isothiocyanate; BIOC (7), benzyl isocyanate; BCHO (5), benzaldehyde; BDOH (5a), benzyl dialcohol; BOH (6), benzyl alcohol; BCN (4), benzyl nitrile; BNH₂ (3), benzylamine; BCOOH (8), benzoic acid; BCOOR (8a), benzoic acid ester; EMV, electron multiplier voltage; RH, relative humidity; RW, residual water; SIM, single ion monitoring; SPE, Solid phase extraction; SPME, Solid phase microextraction; TIC, Total ion current; VOC, Volatile organic compounds.

* Corresponding author.

E-mail address: ecosio@pucp.pe (E.G. Cosio).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112502>

Received 22 June 2020; Received in revised form 18 August 2020; Accepted 19 August 2020

Available online 29 August 2020

0031-9422/© 2020 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

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

which they undergo freeze-thaw cycles, intense radiative exposure and harsh mechanical manipulation. The resulting dry material is then milled into flour. Maca roots range considerably in size and their drying times vary accordingly and require sorting and collection of the dried material as the process moves along.

In a previous report (Esparza et al., 2015) we made an initial characterization of the glucosinolate and lipid hydrolytic processes which result in the final chemical profile of dried maca flour. We also provided first evidence for the exclusively postharvest origin of the benzylalkamides, macamides, present in dried roots, as a condensation product of benzylamine, a benzyl glucosinolate (1) breakdown metabolite, with free fatty acids generated during the drying process (Fig. 1). Later work by other groups (Chen et al., 2017; Zhang et al., 2020), has provided insights on the impact of mechanical pre-processing of the plant material and drying temperature on macamide (9–13) yields under laboratory conditions. However, glucosinolate hydrolysis is a fast process which, in drying tissues, is taking place continuously as tissue dehydration and disruption proceed. Our present knowledge of glucosinolate catabolism comes from bacterial, insect, mammalian and plant models (Blažević et al., 2020; Wittstock et al., 2016; Jeschke et al., 2016; Sørensen et al., 2016; Tang et al., 1972; Yábar et al., 2011). The drying of maca roots offers potentially interesting insights on the sequence of reactions, enzyme-catalyzed or spontaneous, that determine the chemical profile in root flour from a Brassicaceae.

The release and allocation of glucosinolate breakdown products during drying to various metabolic routes takes place in an environment where water potential, pH and redox status are slowly shifting and where there are progressive increases in the concentrations of free sugars and fatty acids. Prevailing conditions in the tissue may promote condensation of benzylamine and formation of bioactive amides or can lead to deamination and formation of a variety of alternative benzenoids. These two outcomes can be considered competitive and their rates depend on the existing pool of benzylamine and the mechanisms by which benzenoids can be formed from benzylamine or, possibly, directly from benzyl isothiocyanate (2), the major transient glucosinolate breakdown product in maca. The present report provides a detailed time-course of glucosinolate metabolites in tissues and headspace during drying under controlled conditions and proposes a sequence of competing pathways that can modulate the biochemical profile and

bioactive and sensory properties of the finished flour.

2. Results

2.1. Glucosinolate hydrolytic VOC profiles

In a previous report (Esparza et al., 2015) we monitored the release of volatile glucosinolate hydrolysis products during oven drying using a headspace accumulation approach. This involved sampling with solid phase microextraction fibers (SPME) under static (no flow) headspace conditions. These conditions allowed time resolutions of over 1 h, which for the purpose of this study were unsatisfactory. We retained the relatively robust SPME sampling technique and opted instead for a flow chamber setting with access ports where we could insert temperature and relative humidity probes along with SPME fibers (Fig. S1,A and Experimental). The chamber was placed in an incubator and air flow through the chamber was regulated to ensure complete replacement of one chamber volume every 15 min. Under our temperature and air flow conditions, calculated SPME 90% equilibration times were 15 min which enabled reproducible VOC sampling during the early periods after root shredding.

Fig. 2 shows, as expected, that the 3 main hydrolysis products detected, BITC (2), BCN (4) and BIOC (7) display almost instantaneous rises from 0 in headspace concentration with slower drops over the next 16 h through conversion into less volatile intermediaries. The isothiocyanate (2) is the largest hydrolytic product with 7 and 4 amounting to about 3% of 2, each measured as total ion current (TIC) in the mass detector. It can also be noted that all three compounds show a second, smaller, peak 24 h after start of the drying process. The most likely interpretation for this is that the very early large peak is the result of tissue damage during shredding of maca roots to generate the smaller fragments for drying. The second peak, which displays significantly slower kinetics, originates from glucosinolate hydrolysis due to destruction of tissue during drying. This process is spread over 72 h after which residual humidity in the material reaches between 2 and 8% (20–80 mg g⁻¹ dry wt.).

The behavior of the other two VOCs observed, aldehyde (5) and alcohol (6), can be expected from secondary conversion products of hydrolysis. It is worth noting that while 5 displays a narrow peak at 8 h it

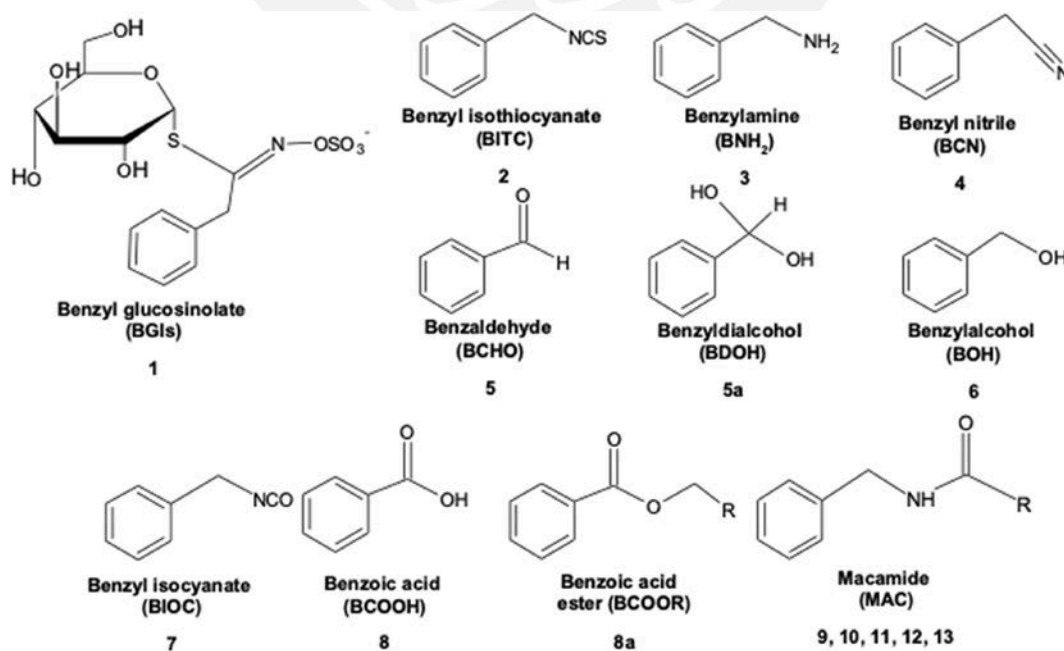


Fig. 1. Benzyl glucosinolate and hydrolytic postharvest metabolites mentioned in the text. For macamides R = palmitic acid (9), stearic acid (10), oleic acid (11), linoleic acid (12), linolenic acid (13).

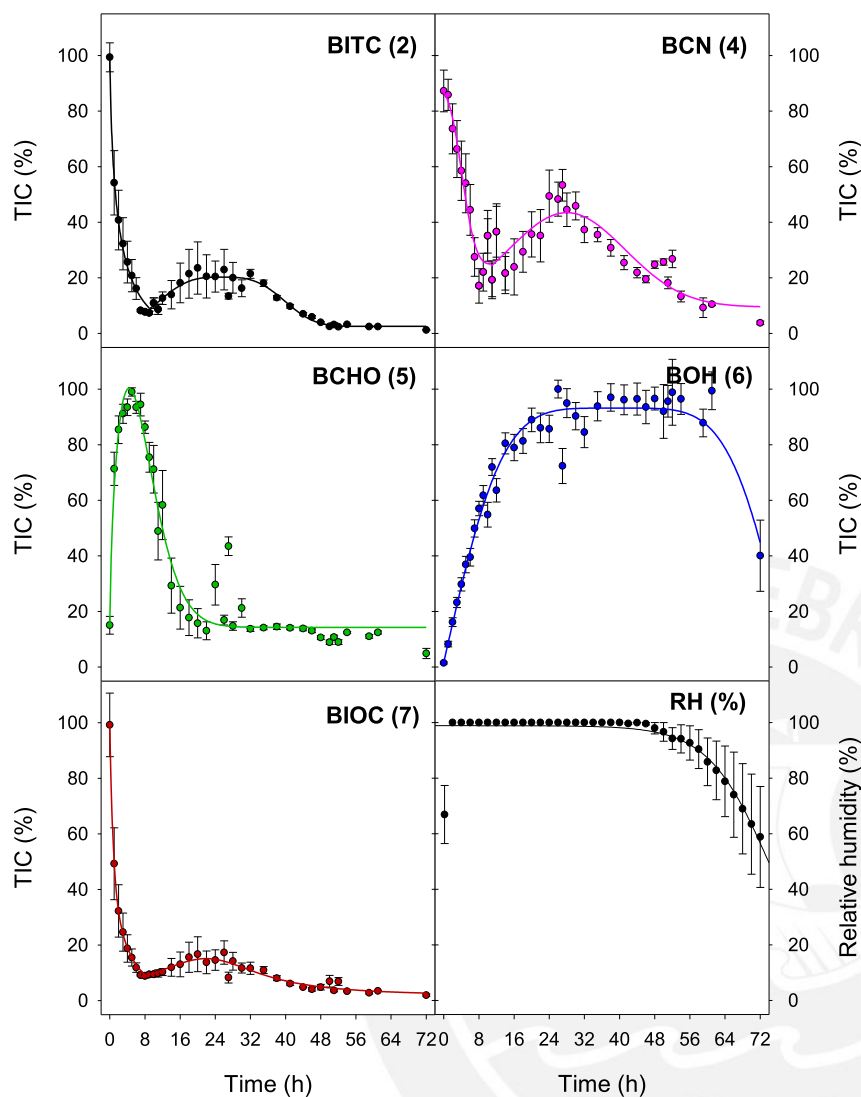


Fig. 2. Time course of major VOCs from glucosinolate hydrolysis measured by headspace SPME-GC-MS. Values are expressed as percentage of average peak total ion current (TIC) for each compound. Compounds, from top left are: benzyl isothiocyanate (BITC, 2), benzyl nitrile (BCN, 4), benzaldehyde (BCHO, 5), benzyl alcohol (BOH, 6), benzyl isocyanate (BIOC, 7), and average relative humidity (RH) inside the chamber (N = 9). Peak TIC values ($\times 10^7$) for the compounds were: 238.42 (2, 100%); 2.88 (4, 1.2%); 34.9 (5, 14.6%); 28.17 (6, 11.8%) and 3.75 (7, 1.6%). Values in parenthesis after the compound number denote the relative intensity of the peak in relation to the isothiocyanate peak. RH = relative humidity in the headspace.

is detectable from very early on and, after reaching its peak, drops sharply to a lower amount, around 20% of its peak value, and remains at that level until the end of the drying period. In contrast, 6 has a much broader peak that spans from 16 to 56 h and dropping to about 40% of its peak value by the end of drying run. Maximal detector response (as Total Ion Concentration) was broadly similar for both compounds and amounted to 14.6% for 5 and 12% for 6 of the maximal response observed for the isothiocyanate (2). The profiles of the detected VOCs (2, 4, 5, 6, 7) agree with what has been reported for glucosinolate hydrolysis (Halkier and Gershenzon, 2006; Vaughn and Berhow, 2005). The time course profiles of 5 and 6, point out to a specific generation sequence. The relatively narrow pulse of 5 in the gas phase is closely followed by the corresponding rise of 6, which then remains stable until it tapers off as tissue desiccation increases. The amounts of 6 in the headspace only start decreasing as relative humidity in the chamber starts also dropping clearly indicating that residual water in the tissues is reaching its end point.

2.2. Benzylamine is the primary accumulation product of glucosinolate hydrolysis in dried maca roots

In order to correlate glucosinolate substrate concentrations with those of its volatile and semivolatile hydrolytic metabolites in the tissues during drying, we redesigned our drying chamber set up to allow for

greater amounts of tissue. We modified a 70 l laboratory oven and reduced its effective volume to 35 l by setting up a plexiglass partition within the chamber. Air flow (70 l h^{-1}) entered through the bottom of the oven and moist air was eliminated through a chimney connecting the plexiglass partition with the air outlet above the oven (Fig. S1,B). The air entering the oven went through multiple outlet tubing to ensure mostly homogenous airflow from the bottom up to the exhaust chimney. A total of 640 g of shredded roots were processed in 16 steel mesh trays per experiment, the time resolution of the 72 h drying process was limited to 9 sample points for these experiments. Tissue samples were extracted directly with solvent and analyzed by GC-MS or HPLC as described in Experimental.

Fig. 3 shows the time course of glucosinolate (1) degradation during drying compared to those of its primary initial hydrolytic products BITC (2) and BCN (4), the main aminated product, BNH_2 (3), and one group of terminal accumulation products, macamides (9–13). Results are presented as molar fraction of the initial benzyl glucosinolate (1) amount in order to illustrate the relative flow through intermediary to final accumulation products.

Within the first few minutes one can observe a very rapid conversion of about 40% BGL (1) into BITC (2) as a result of the tissue fragmentation performed prior to the drying process. A minor amount of glucosinolate (0.05%) is converted to nitrile (4) in these first instants, which shows the preference under these conditions in maca for isothiocyanate

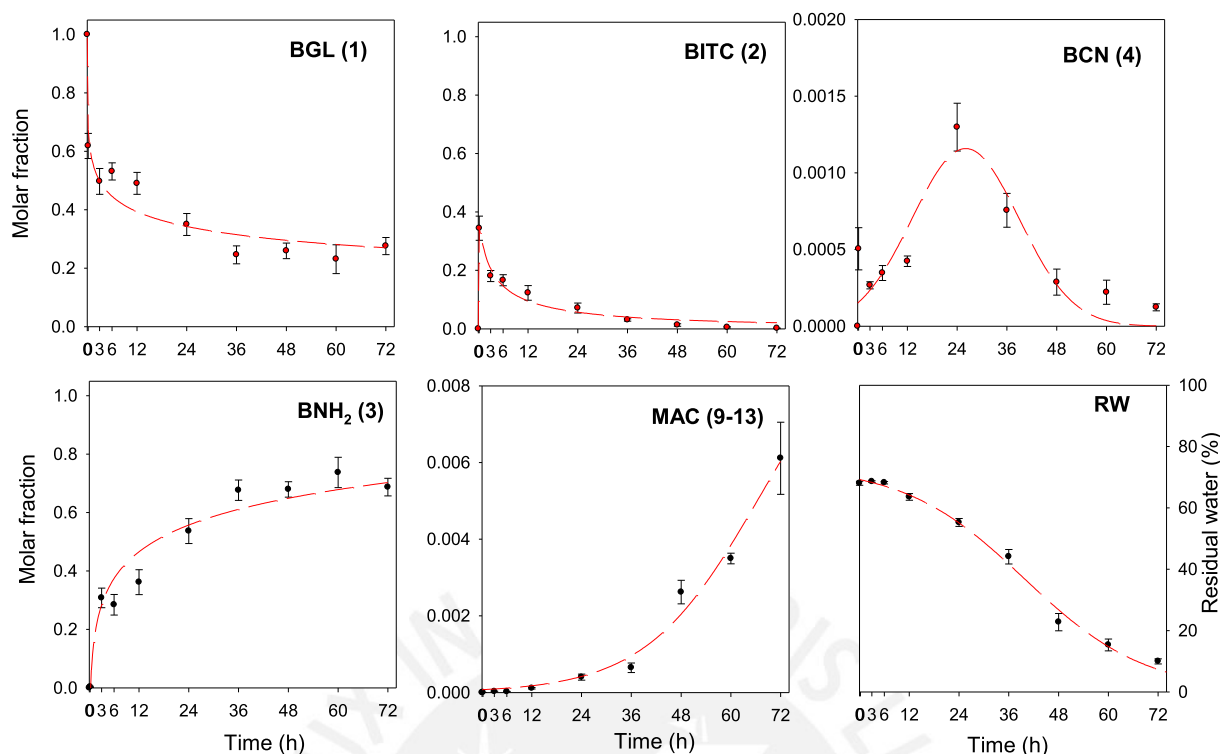


Fig. 3. Tissue concentrations during oven drying for benzyl glucosinolate (BGL) and its metabolites. Drying maca tissue was extracted in solvent and the levels of benzyl glucosinolate, its primary hydrolytic products (BITC, BCN) and two products that accumulate in the flour, benzyl amine (BNH_2) and macamides (MAC) were analyzed. RW represents residual humidity. Hydrolytic and final accumulation product patterns match those previously reported (Esparza et al., 2015), although for this study, a 72 h drying period and 35 °C constant temperature were employed. Values are expressed in molar fraction of initial glucosinolate concentration, where $1 = 36 \pm 5 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry wt. ($N = 6$). Nonlinear regression coefficients for the compounds were: $R^2 = 0.941$ (BGL, 1), $R^2 = 0.971$ (BITC, 2), $R^2 = 0.777$ (BCN, 4), $R^2 = 0.955$ (BNH_2 , 3), $R^2 = 0.985$ (MAC, 9–13) and $R^2 = 0.993$ (RW).

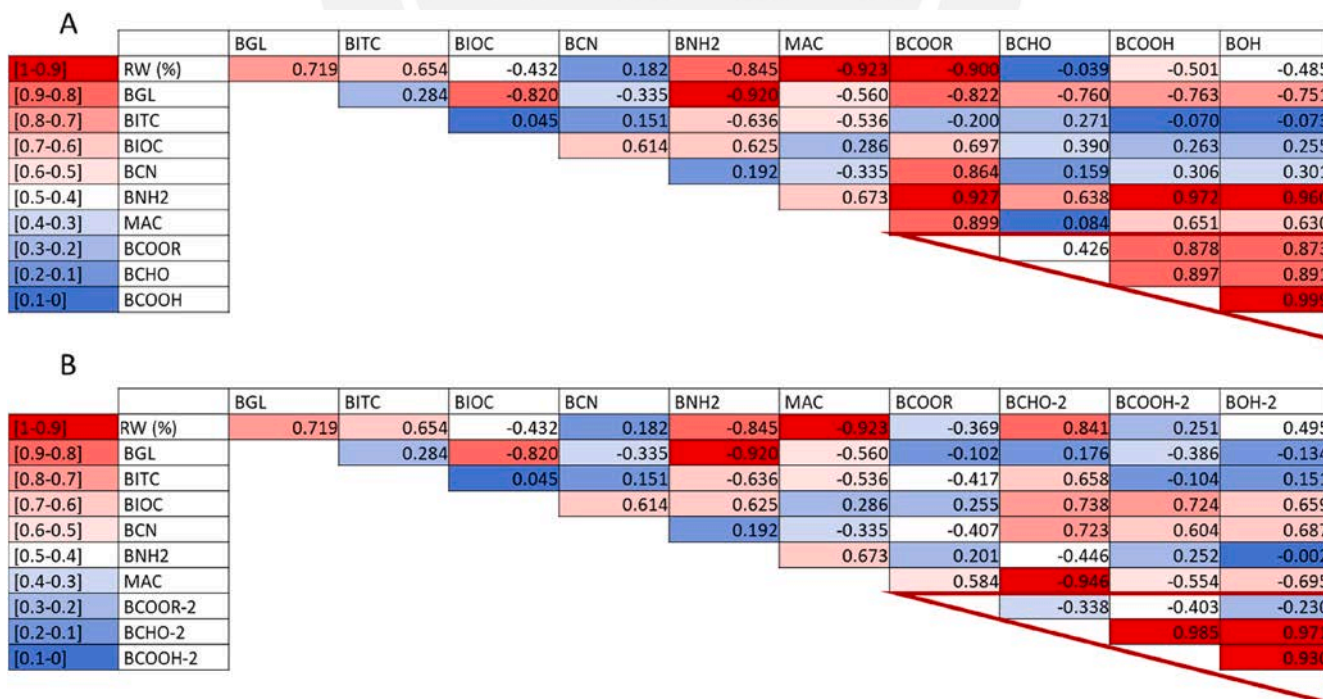


Fig. 4. Pearson correlation values for glucosinolate hydrolytic products. Panel A shows the correlation of metabolites for the early stage of drying, where reactions are caused by direct damage to the tissue by shredding. Panel B shows the correlation between intermediaries as a result of the late stage tissue dehydration. BCOOR-2, BCHO-2 and BCOOH-2 shown in panel B correspond to data points in Fig. 5 shown as part of the red solid line while BCOOR (8a), BCHO (5) and BCOOH (8) in panel A correspond to the early stage in the figure shown in solid black lines. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

formation over other primary hydrolytic products. Nitrile (4) amounts kept rising slowly over 24 h but never exceeded 0.12% of initial glucosinolate values. The rise in benzyl amine (3) mirrors BITC (2) decline with a fast rise over the first hour to about 30% of the initial glucosinolate molar amount followed by a slow increase to near 70% towards the end of the drying period. Correlation analysis supports the 1 to 3 metabolic sequence with an R^2 of -0.92 ($p < 0.05$, Fig. 4) for the patterns of the drop in benzyl glucosinolate (1) concentration and the corresponding rise in benzylamine (3). Benzylamine accounts for the largest molar percentage of final glucosinolate hydrolysis products in dried maca. Macamide formation, on the other hand, proceeds slowly, rising steeply only after 36 h but reaching a final value of only 0.6% of the initial glucosinolate molar content. Macamide accumulation displays a low positive correlation ($R^2 = 0.673$, $p = 0.033$) with that of the amine (3) and appears more dependent on free fatty acid availability and the advance of tissue dehydration for its formation (Esparza et al., 2015). Our results show a clear correlation of macamide formation with tissue dehydration ($R^2 = -0.923$, $p < 0.0005$) a condition which may promote condensation of fatty acids with benzylamine.

2.3. Deamination is the switching point for the formation of macamides or benzenoids

Accumulation profiles of the main deaminated benzenoid products of glucosinolate hydrolysis, benzaldehyde (BCHO, 5), benzyl alcohol (BOH, 6) and benzoic acid (BCOOH, 8) are shown in Fig. 5. These measurements allowed us to distinguish between a fast hydrolytic process generated by the mechanical shredding of maca tissue to reduce its size for drying and a second, slower, process arising from tissue dehydration. We have tried to separate these two profiles through nonlinear regression. As can be observed, levels of these metabolites rise quickly just after shredding takes place (solid black lines). The initial product of

this sequence is the aldehyde (5) which peaks at 3 h, followed by alcohol (6) and acid (8) at 6 h. Peak values for all three compounds are similar and represent between 0.2 and 0.3% of initial glucosinolate molar amounts. The second peak (solid red lines) arises from tissue dehydration and reaches a maximum at 36 h for all three compounds, after which levels drop rapidly. Peak values for this second stage show strong differences for each compound. While 5 reaches a peak of no more than 0.12% of the glucosinolate, 6 and 8 reach levels of 0.7 and 1.2% respectively. More significant are the differences in ratios between early (A) and late (B) stage peak values. While for 5 the A/B ratio is 1.5, it is 0.5 for 6 and 0.25 for 8. This agrees with a biogenic sequence starting with 5 as the initial deamination product. The lower right panel in the figure shows the profile for benzoic acid esters (BCOOR, 8a) with a fast early accumulation and a progressive rate reduction as the tissue dries in a manner similar to benzylamine (3) described in the previous section. As with 3, benzoic esters (8a) display the profile of a final accumulation product, in this case as potential detoxification products of the acid (8). Maximal molar amounts observed in our trial were around 2.3% of initial glucosinolate values, 27 times less than amine values at the end of the drying period.

Although representing a very small fraction of total glucosinolate hydrolysis, the deaminated benzenoids combined still represent more than twice the amount of macamides formed during drying. In addition to this, benzoic acid and its esters are controlled food preservatives and higher levels in maca flour raise attention by regulators. From the observed profile sequences, deamination of 3 appears to be the source of benzaldehyde (5) and of the redox sequence leading to 6 and 8 with eventual accumulation of benzoic esters (8a).

We explored nitrogen loss in the process by monitoring ammonium ion concentration in the drying tissues. The results (Fig. 6) showed a rapid rise during the first 24 h followed by a slight drop towards the end of the drying process. Ammonium ion levels in the tissues reached

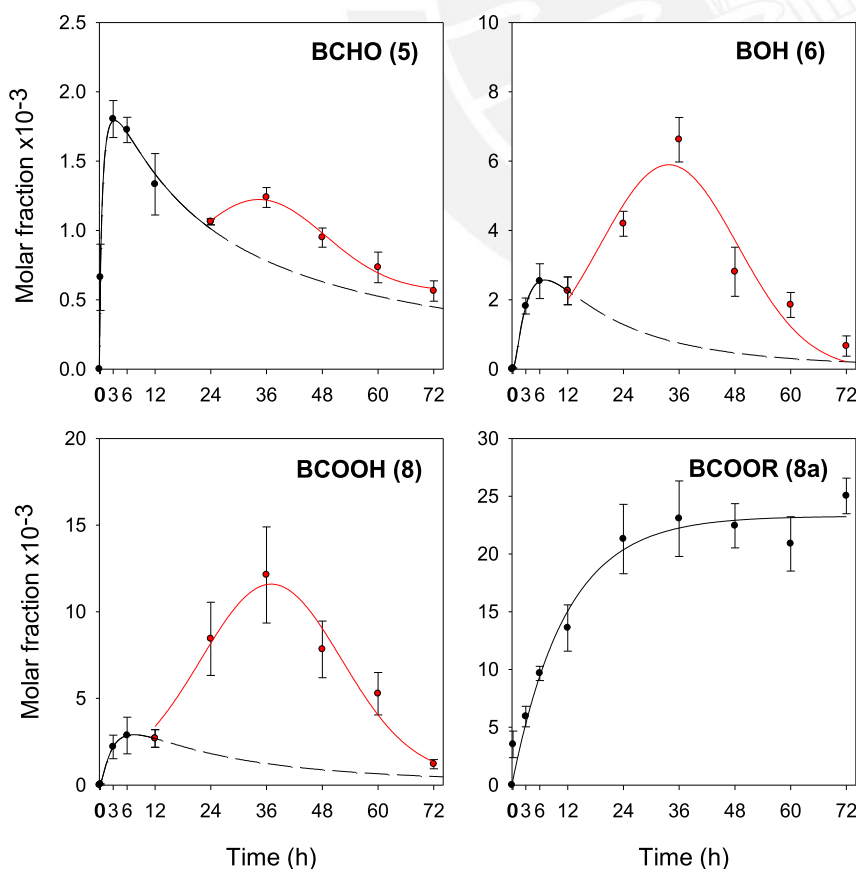


Fig. 5. Time course profiles for transient and final deaminated benzenoid products in drying maca tissues. Kinetic profiles show two stages, early “fast” kinetics (solid black lines) that take place in the initial 12 h, corresponding to damage to the tissues done by shredding to reduce size for drying and a second “slow” stage (solid red lines) that shows the dehydration of the tissues in the later part of the drying process. Data points corresponding to the initial and the late phases have been subjected to nonlinear regression separately. The nonlinear regression coefficients for the metabolites were for BCHO (5): $R^2 = 0.9962$ (early phase), $R^2 = 0.9880$ (late phase), for BOH (6): $R^2 = 0.9999$ (early), $R^2 = 0.9522$ (late), BCOOH (8): $R^2 = 0.9999$ (early), $R^2 = 0.9526$ (late), BCOOR (8a): $R^2 = 0.9677$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

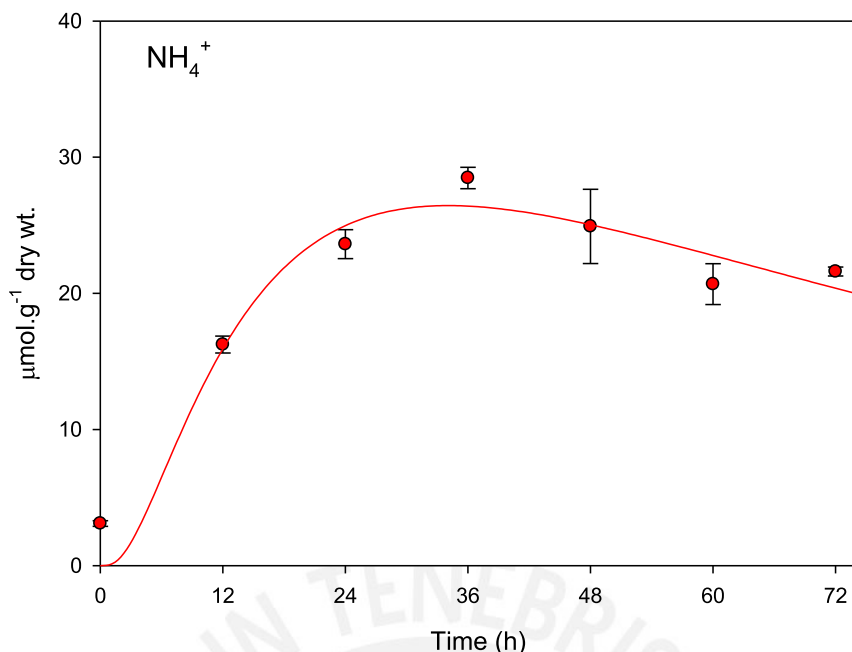


Fig. 6. Time course for the concentration of ammonium ion in maca tissues during drying. Deamination of benzyl amine and amino acids by amine oxidases are potential sources of ammonia under our short (72 h) drying conditions. Peak values of NH_4^+ are $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry wt.. Total amount of deaminated benzenoids accounts for only $0.75 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry wt. indicating other major sources of ammonium in the process. Curve adjusted by nonlinear regression ($R^2 = 0.9472$).

maximal concentration between 24 and 36 h of drying time, coinciding with the benzenoid peak. With peak values around $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry wt., ammonium represents 100% of benzylamine nitrogen molar amount, a considerable excess over the estimated 3% of benzenoids that would have actually arisen from deamination of glucosinolate hydrolytic products under our experimental conditions. Ammonium release has to be accounted for from other nitrogenated sources during drying.

3. Discussion

3.1. Benzylamine pool arises from isothiocyanate hydrolysis while tissues are still in a hydrated stage

Fig. 7 summarizes a proposed metabolic scheme for the drying process based on the findings presented here. We have divided it in steps, A through F, that group metabolic reactions taking place at different stages

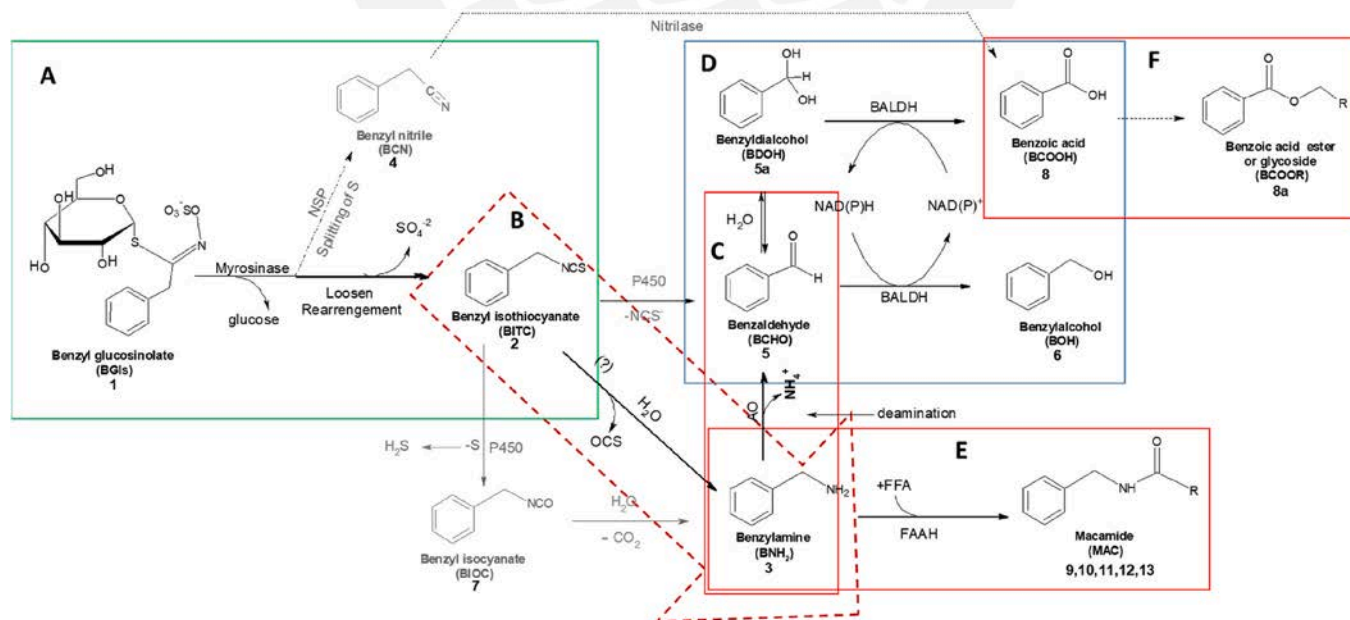


Fig. 7. Proposed scheme for reactions taking place during the maca drying. The sequence is based on the main hydrolytic metabolites observed during the drying process. Step A describes reactions generating the initial hydrolysis products and including BITC (2), BCN (4) and BIOC (7). Step B is the formation of BNH_2 (3), the main accumulation product, from BITC (2). Step C describes deamination of BNH_2 (3) to generate various deaminated benzenoids. Step D corresponds to the disproportionation reactions leading to pools of BCHO (5), BOH (6) and BCOOH (8) through the action of an aldehyde dehydrogenase. Step E is the condensation of BNH_2 (3) with free fatty acids to produce macamides (MAC 9–13) and step F corresponds to esterification or glycosylation of BCOOH (8) as a detoxification mechanism. Numbers correspond to those in Fig. 1. Dark lines show favored reactions according to our results. Compounds in light gray are minor transient products.

of tissue hydration and levels of oxidation.

Steps A and B, as seen in section 2.2, point out to strong evidence for a BGL (1)-BITC (2)-BNH₂ (3) sequence for glucosinolate hydrolysis during drying. This observation coincides with previous reports on the mechanism for glucosinolate thermal degradation (De Nicola et al., 2012). Thermal hydrolysis of 2 in aqueous solution can take place through the attack of a water molecule that incorporates an OH into the central electrophilic carbon of the isothiocyanate to form a benzoyl-carbamothionic O-acid with release of carbonyl sulfide to form benzylamine (3) (Fig. S2). Although the mechanism, as described, suggests a spontaneous reaction, it by no means rules out enzyme involvement in our particular conditions with active site residues generating the OH⁻ nucleophile. This reaction is rapid and takes place mostly during the initial hours of the drying process, when the tissues are still highly hydrated. It is noteworthy that the amine (3) is the main product observed in maca. There are few reports on glucosinolate-like free amines accumulating at this level (Agerbirk and Olsen, 2012). Blažević et al. (2020) have recently reported such an occurrence but in lesser proportions through conjugation of indol-3-ylmethyl isothiocyanate with glutathione and subsequent hydrolysis to form indol-3-ylmethyl amine.

After 24 h the rate of accumulation drops and the concentration of 3 in the tissues rises only very slowly due to limited rates of isothiocyanate (2) hydrolysis in the now drier environment. Once the amine is formed, it appears relatively stable and accumulates under increasingly dehydrated conditions. Limited losses from the amine pool are mediated by two competing reactions. One is deamination to benzaldehyde (5) (step C) through the action of amine oxidases present in the tissue and followed by a disproportionation reaction (step D) as explained in the next section to form the corresponding alcohol (6) or carboxylic acid (8). The alternative, step E, is condensation of the amine (3) with free fatty acids arising from the slow hydrolysis of storage triglycerides and membrane lipids to produce amides (9–13). This reaction appears to be favored in dehydrating tissue as explained by the slow accumulation kinetics observed for the macamides. During the initial phases of drying, when tissue hydration is high and free fatty acid concentration is still low is when peaks of the deaminated benzenoids (5, 6, 8) can be observed. As residual humidity in the tissues drops, condensation with fatty acids to form amides increases ($R^2 = 0.92$) and also the formation of esters and glycosides of 8 becomes important ($R^2 = 0.9$) (step F). These reactions appear to be favored in the presence of low residual humidity in the tissues.

3.2. Are maca benzenoids generated by an aldehyde dehydrogenase acting in a bio-Canizzaro reaction pattern?

As pointed out in section 2.3, peak concentrations of deaminated benzenoids display sequentially higher values (in molar fraction of initial glucosinolate); 0.12% (BCHO, 5), 0.7% (BOH, 6), 1.2% (BCOOH, 8) and 2.1% (BCOOR, 8a). The first three are transient, peaking at 36 h, while benzoic esters (8a) accumulate during drying. Conjugates and esters are common detoxification products in dicot vacuoles (Matile, 1990). Published reports indicate that free benzoic acid is eliminated rapidly through these procedures in plants (Chrikishvili et al., 2006). The release of benzoic acid from glucosinolate catabolism during tissue drying very likely triggers reactions leading to the formation of these moieties and this process can provide the metabolic “pull” for oxidation of 5 into 8. On the other hand, the temporal and molar ratio relationships between 5, 6 and 8 suggest an interlinked process that could be explained invoking an asymmetric Canizzaro-type reaction where the aldehyde is substrate and alcohol and acid are products. Correlation analysis (Fig. 4) shows high values between 5 and 8 ($R^2 = 0.985$, $p < 0.05$) and between 5 and 6 ($R^2 = 0.971$, $p < 0.05$). This process has been proposed for a number of prokaryotic and eukaryotic aldehyde dehydrogenases (Wuensch et al., 2013) and provides adequate explanation for the observed behavior, requiring only one enzyme, as opposed to needing an additional aldehyde oxidase (Ibdah et al., 2009) and being

essentially redox neutral (Fig. 8). According to this model, two half-reactions are catalyzed by the enzyme. The aldehyde in aqueous solution is in equilibrium with its diol form (5a) and provides substrate for both. The oxidative half-reaction leads from the diol (5a) to benzoic acid (8) and the reductive half-reaction converts aldehyde (5) into benzyl alcohol (6). This sequence, as described, should lead to the accumulation of 8 and 6, however neither is a final accumulation product in our experiments. Benzoic acid removal takes place through conversion into esters (8a) (Fig. 7 step F), a process that explains why it does not accumulate. The lack of accumulation of (6), which appears as a transient product peaking in the tissue at 36 h requires a more elaborate explanation. Two possibilities could explain this, the concentration of 6 in the gas phase, as observed using SPME-GC-MS (Fig. 2) starts peaking only at 8 h reaching a signal value 14% of that of isothiocyanate (2) and stays at maximal values almost throughout the drying process. This is under conditions of constant airflow through the chamber which constantly removes the alcohol from the gas phase. Benzaldehyde (BCHO, 5) peaks very early in the gas phase, at 8 h, with signal values about 12% of the isothiocyanate peak, and drops quickly so that by 24 h levels are close to only 2% of the peak isothiocyanate signal, and remain like that until the end of the process. We speculate that conversion of 5 into 6 as shown in Fig. 8 results in removal of this product from the tissue through evaporation and gas transport as shown by the VOC kinetics. Boiling points of 178 °C (5), 205 °C (6) and 250 °C (8) suggest the potential for gas phase removal of both (5) and (6) but (5) is also being processed enzymatically into alcohol and acid which also explains its transient appearance as a VOC. A second factor that could explain the removal of 6 is esterification with 8 or another short chain free acid. This would produce benzyl benzoate, a product whose detection proved inconsistent in these experiments, or benzyl acetate, which we have also observed infrequently in analyses of the samples, which lends more weight to the gas phase removal explanation.

3.3. Conclusions

The biochemistry of traditional maca root postharvest drying is a slow and complex process, spread over 6–8 weeks until complete. This study used 72 h low-temperature oven drying conditions under air flow to explore the factors that influence the final composition of glucosinolate breakdown products in the dry product. Following the profile of hydrolytic metabolites on a molar fraction basis of initial glucosinolate allowed us to account for 99% of all benzyl moieties present at the end of the drying process. The results show clearly that the primary accumulation product of benzyl glucosinolate after tissue drying is benzyl amine which accounts for over 94% of hydrolyzed substrate. In dehydrated tissue the amine is very stable and other products derived from its metabolism, such as macamides or deaminated benzenoids, account for

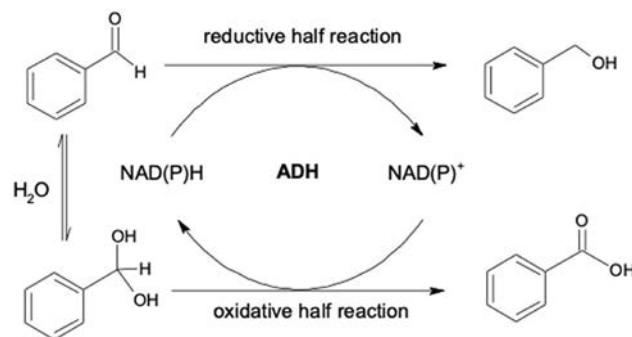


Fig. 8. Reaction scheme for the formation of BOH (6) and BCOOH (8) from reactive benzaldehyde through a Cannizzaro type reaction, catalyzed by a benzaldehyde dehydrogenase (based on Wuensch et al., 2013). The proposed scheme would require only one enzymatic activity for both the oxidative and reductive half-reactions.

less than 5% of starting material. The observed results allow to speculate that the rate of dehydration modulates the degree of benzyl amine conversion into other products and, more relevant, whether these condense with fatty acids to form macamides or are deaminated and accumulate as benzoic acid esters. It has been speculated previously (Esparza et al., 2015) that macamide formation could be optimized by playing with the molar ratio of amine to fatty acid, which is usually 10:1. This study suggests that the determinant factor is the rate of dehydration. Amide formation seems to be favored once hydration of the tissue is significantly reduced. A slow rate of dehydration with tissue damage favors the deamination of benzylamine and the formation of aldehyde, alcohol and acid benzenoid moieties through the action of amine oxidases and an aldehyde dehydrogenase catalyzing a disproportionation in a Canizzaro-like reaction. The prevailing redox and hydration conditions in the tissue will favor then the accumulation of benzyl alcohol and benzoic acid. The esterification of the acid provides a metabolic pull in its direction while benzyl alcohol goes into the gas phase and is eliminated in greater part both in oven and field conditions.

4. Experimental

4.1. General procedures and instrumentation

Structural characterization of synthetic amides was performed using a Bruker 500 UltraShield NMR (Karlsruhe, Germany), a PerkinElmer series 1600 FT-IR spectrometer (Waltham, MA) and a Thermo Spectronic Genesys 6 (Rochester, NY) UV/Vis spectrophotometer. Data collection for environmental variables for oven drying experiments used OM-62 units from Omega Engineering (Stamford, CN), for ambient laboratory conditions and a XR5 SE system from Pace Scientific (Mooresville, NC) equipped with a TRH-100 temperature and humidity sensor for inside the drying oven. Statistical treatment and nonlinear regression analyses were performed using SigmaPlot 11 for Windows (Systat Software).

4.2. Chemicals

Benzyl glucosinolate (1) was obtained from Calbiochem/Merck Biosciences (San Diego, CA). Benzyl isothiocyanate (2), benzyl nitrile (4), benzyl alcohol (5), benzaldehyde (6), benzyl isocyanate (7), fatty acids and reagents for amide synthesis were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Benzoic acid (8) and benzylamine (3) were from Merck (Darmstadt, Germany). The benzylamides of palmitic (MAC16, 9), stearic (MAC18, 10), oleic (MAC18-1, 11), linoleic (MAC18-2, 12) and linolenic (MAC18-3, 13) acids were synthesized in our laboratory for use as standards according to Esparza et al. (2015). All other solvents and reagents were analytical or HPLC grade.

4.3. Plant material

Fresh yellow maca roots were obtained from a local market and originated from the Junín region in central Peru. Oven drying tests in the laboratory were carried out using maca roots of a uniform size, approximately 3 cm in diameter. These were washed with distilled H₂O, pat-dried with filter paper and shredded manually into 2 mm-strips using a kitchen stainless steel vegetable shredder.

4.4. Oven drying experiments

Six hundred and 40 g of shredded fresh maca roots were placed in sixteen 100 cm² stainless steel mesh trays (40 g fresh wt./tray) and placed in a 70 l oven at 35 °C. Moist air was pumped into the oven through an activated charcoal trap and a chamber with distilled water, both at lab temperature (22 °C). Duplicate random samples were taken at 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h, and mixed gently to homogenize them and separated into duplicate samples, weighed and stored in

aluminum foil pouches in liquid N₂ until analyzed by HPLC and GC-MS. The time zero sample was shredded directly into liquid N₂ for storage. Three independent drying experiments were carried out at different times and the results presented here are average values (N = 6).

4.5. Extraction of plant material

Shredded maca samples (1 g), frozen in liquid N₂, were placed in polypropylene centrifuge tubes (15 ml) containing H₂O-MeOH (10 ml, 30:70, v/v) preheated to 70 °C. The tubes were flushed with N₂ gas, closed, placed in a heated water bath at 70 °C for 10 min and then sonicated for 30 min. They were then centrifuged at 10000×g for 15 min. The supernatant was vacuum filtered through Whatman GF/A filters and the filtrate collected in glass culture tubes (50 ml) with Teflon-lined caps. The pellet was re-extracted for 10 min and the filtered supernatants were pooled. Samples were stored under N₂ at -20 °C until analyzed.

4.6. Analysis of amides and free fatty acids

Macamides (9–13) and free unsaturated fatty acids were analyzed using a modification of previously reported methods (Esparza et al., 2015; Ganzera et al., 2002; McCollom et al., 2005). Samples were dissolved in H₂O-MeOH (7 ml, 50:50, v/v) and loaded onto a Merck Lichrolut RP-18 (500 mg) reversed phase SPE column. The columns were washed with 5 ml H₂O-MeOH (50:50, v/v) and eluted with 2 ml MeOH. The eluate was analyzed in an Agilent Infinity 1290 UPLC quaternary pump system coupled to a diode array detector in series with an Agilent 6120 single quadrupole mass detector using atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Instrument conditions were: drying gas temperature 250 °C, vaporization temperature 400 °C, drying gas flow 9.0 l min⁻¹, nebulization pressure 25 psi, capillary voltage (positive) 4000 V, (negative) 4000 V, Corona (positive) 4 μA, (negative) 4 μA. Signals in full scan 80–550 m/z, APCI mode, (50% time each polarity), signals in SIM mode (see Table S1 supplementary material).

Samples (10 μl) were injected into a Merck LiChrospher 100 RP-18 column, 150 mm × 4.6 mm i. d. (5 μm). The column heater was set at 40 °C and flow rate was 1 ml min⁻¹. The solvent program is shown in Table S2. The results present total macamides as a sum of compounds 9–13.

4.7. Analysis of benzylamine and free amino acids

Amines were analyzed by derivatization with *o*-phthaldialdehyde (OPA, Sigma, St. Louis, MO) followed by reversed phase HPLC. The reagent contained OPA (27 mg) in MeOH (0.5 ml) diluted with sodium borate buffer (5 ml) and 2-mercaptoethanol (25 μL). Each pooled MeOH extract (180 μl) was diluted with 0.4 M Na borate buffer (25 μl, pH 9.5) and 20 μl of tyramine 0.1 mg ml⁻¹ was used as internal standard, before adding OPA reagent (25 μl). The mix was vortexed for 1 min, centrifuged for 2 min at room temperature and 10 μl were injected for HPLC analysis.

The HPLC instrument used was an Agilent 1260 Infinity II. The column used was a Merck LiChrospher 100 RP-18, 125 mm × 4.6 mm i. d. (5 μm). Oven temperature was kept at 30 °C and detection was performed at 340 nm. The solvent system consisted of MeOH (solvent A) and 20 mM NaOAc buffer, pH 6.0 (solvent B). The program consisted of a 9 min gradient from 40% to 100% A and 4 min at 100% A (Esparza et al., 2015; Simons and Johnson, 1978).

4.8. Analysis of glucosinolates

Benzylglucosinolate (1) was analyzed as its desulfated product with slight modification from the literature (Brown et al., 2003; Moldrup et al., 2011). One ml of the pooled hypocotyl extracts, obtained as in 4.5, was diluted to MeOH-H₂O (50:50, v/v) by addition of 0.5 ml of water. A

1.5 ml aliquot was applied into conditioned Agilent Bond Elut-SAX SPE columns (500 mg). The latter were washed sequentially with MeOH–H₂O (5 ml, 70:30, v/v) and then conditioned with 0.02 M MES buffer (Sigma, St. Louis, MO) (1 ml, pH 5.2) after which 150 μ l (150 units) of sulfatase (H-1, *Helix pomatia*, Sigma, St. Louis, MO) was added and the columns were incubated overnight at room temperature. The following day desulfoglucosinolates were sequentially eluted with MeOH–H₂O (800 μ l, 70:30, v/v) and H₂O (800 μ l). Both eluates were pooled in 2 ml autosampler vials and used directly for analysis. HPLC analysis was performed using a Merck LiChrospher 100 RP-18, 250 mm \times 4.6 mm i. d. (5 μ m) column, column heater temperature 30 °C and a 1 ml min⁻¹ flow rate. Samples (20 μ l) were injected and elution was monitored at 230 nm. The gradient program used CH₃CN (solvent A) and H₂O (solvent B) and was as follows: 6 min from 2% A to 5% A, 2 min 5% A to 7% A, 10 min 7% A to 21% A, 5 min 21% A to 29% A, 2 min 29% A to 100% A and 2 min at 100% A (Brown et al., 2003).

4.9. VOC analysis

Headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) of volatiles was performed using fused silica fibers coated with a 30 μ m layer of DVB/Carb/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane) (Supelco, Bellefonte, PA). The fibers were conditioned following the manufacturer's instructions by exposure in the GC injection port at 270 °C for 30 min. For the analysis, shredded maca (10 g) was placed in a closed, 600 ml cylindrical glass chamber with 6 glass ports with screw cap: two for air flux inlet and outlet, three for volatile sampling with PTFE septa and one for a temperature and humidity sensor (Figure S1A). The chamber was placed in an oven at 35 °C, constant air flow (40 ml min⁻¹) was provided by an aquarium pump and previously filtered with an activated carbon filter. SPME fibers were introduced through the septa to expose them to the headspace within. SPME fibers were exposed to the headspace for 15 min. Samples were taken at different times intervals (from 0 to 8 h, every hour, from 8 to 72 h, every 3 h) for analysis by headspace GC–MS analysis.

After exposure, the fibers were inserted into the injection port of the GC for analysis and exposed for 8 min. GC–MS analysis was performed using an Agilent 7890 B GC coupled to a 5977 single quadrupole MSD. The GC was equipped with a VF-23 ms column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness). Injector temperature was set at 250 °C, splitless, and He carrier gas flow rate was 1 ml min⁻¹. The oven temperature was initially held at 45 °C for 4 min, and then raised to 190 °C at 15 °C min⁻¹, then to 240 °C at 30 °C min⁻¹ and finally held for 2 min at 240 °C. Electron ionization was set at 70 eV. Identification of the compounds was performed by the use of pure standards, retention indices and by mass spectral analysis used AMDIS 32 (version 2.69, NIST), the NIST Mass Spectral Search Program and the NIST 2011 mass spectral library.

4.10. Analysis of glucosinolate hydrolytic products

Shredded maca samples (1 g) were extracted with 20 ml of CH₂Cl₂ in an ultrasonic bath (Branson 5800, Danbury, CT) set at 30 °C and 40 Hz for 1 h. The supernatant was filtered through a sodium sulfate column with a GF/A filter to a 50 ml glass tube.

For the analysis of the lower abundance compounds (4,5,6,7), extracts were analyzed by GC-MS in an Agilent 7890 B equipped with a multimode injector (MMI) in solvent-vent mode. Samples (25 μ l) were injected and the injector was held at -5 °C with pressurized liquid nitrogen for 3.3 min to vent excess solvent, then taken to 250 °C at 600 °C min⁻¹, and held at 250 °C for 2 min. Separation was performed in a VF-23 ms (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m) column and the eluate analyzed in an Agilent 5977 quadrupole mass detector as described in 3.9. The temperature program started at 45 °C, and taken to 190 °C at 15 °C min⁻¹, then to 240 °C at 30 °C min⁻¹, and held for 2 min at 240 °C. The analysis of BITC (2), a major primary hydrolytic product, required only the injection of 1 μ l, of extract using a split ratio of 20:1 and injector temperature 250 °C. All other conditions remained unchanged.

4.11. Benzoic acid extraction and analysis

Ten ml of acidified CH₂Cl₂ (0.1% HCl) were used to extract the equivalent to 0.5 g dry weight of maca in 10 ml glass tubes with PTFE liner screwcaps. Samples were vortexed for 30 s and then sonicated for 1 h at 30 °C. Extracts were dried through a sodium sulfate column, collected in 12 ml glass vials, and stored under nitrogen at -20 °C until analysis.

For GC analysis, benzoic acid (8) was derivatized with MSTFA as follows: 2 ml of CH₂Cl₂ extract were dried in a centrifugal evaporator (Concentrator Plus, Eppendorf) in alcoholic vacuum mode at 30 °C for 20 min, redissolved in 250 μ l of CH₂Cl₂, transferred to a 250 μ l GC vial insert and dried in the concentrator at 45 °C for 15 min. MSTFA was added (20 μ l) and heated to 60 °C for 30 min (Senger et al., 2005). After cooling for 10 min, 80 μ l of methylene chloride was added. One μ l of sample was injected into an Agilent 7890 A GC-FID, equipped with a DB-5 column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m). Injector temperature was 250 °C, split 10:1, gas flow 1 ml min⁻¹. The temperature program started at 50 °C for 4 min, rose to 180 °C at 25 °C min⁻¹, then to 250 °C at 10 °C min⁻¹, and finally to 280 °C at 30 °C min⁻¹ and held for 5 min.

4.12. Hydrolysis of benzoic acid esters

Three ml of 70% maca MeOH extract (from 4.5) were taken to 50% MeOH, 1 N HCl (800 μ l of water and 400 μ l of concentrated HCl) were added to the 3 ml of extract) and heated to 100 °C for 1 h in a dark vial. After the mix had cooled, 2 ml of methylene chloride were added and vortexed for 30 s and then centrifuged at 100 \times g for 10 min. The organic phase was collected, dried with sodium sulfate, vortexed for 10 s, centrifuged at 100 \times g for 10 min, and 1.5 ml of supernatant were transferred to a 2 ml vial and concentrated to 100 μ l in a Concentrator plus (Eppendorf) in vacuum-alcoholic mode for 20 min, and transferred to a GC vial insert, dried and processed as in the previous section.

4.13. Ammonia analysis

One hundred μ l of 70% maca MeOH extract (from 4.5) were taken for derivatization with diethyl ethoxymethylene malonate (DEEMM) adding 175 μ l of sodium borate buffer (1 M, pH 9.4), 75 μ l of methanol and 3 μ l of DEEMM. Samples were sonicated for 45 min at 30 °C, placed in a heating block for 2 h at 70 °C, centrifuged at 20000 \times g for 5 min and the supernatant used for analysis. An Agilent 1260 Infinity II HPLC quaternary pump system with diode array detector was used, with a Merck LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) LiChroCART 250-4 RP-18 (250 mm \times 4 mm, 5 μ m). Flow rate was 1 ml min⁻¹ and column heater was set to 40 °C. Samples (10 μ l) were injected and elution was monitored at 280 nm. The solvent system consisted of acetonitrile (solvent A) and 20 mM NaOAc buffer, pH 4.2 (solvent B). The solvent gradient was 2 min from 20 to 30% A, hold 3 min at 30% A, 5 min from 30% to 50% A, and hold 2 min at 50% (Gómez-Alonso et al., 2007; Redruello et al., 2013).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We wish to acknowledge financial support from the PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACION AGRARIA – PNIA (023-2016-PNIA). We also thank Ecoandino S.A.C. for plant and processed material. E.E. received support from PNIA for an internship at the University of Copenhagen (KU). We thank Drs. Fernando Geu-Flores and Niels Agerbirk of KU for discussions and ideas.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112502>.

References

- Agerbirk, N., Olsen, C.E., 2012. Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* 77, 16–45. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.005>.
- Blažević, I., Montaut, S., Burćul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N., 2020. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry* 169, 1. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>.
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., Gershenzon, J., 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62, 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00549-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00549-6).
- Chen, J.J., Zhao, Q.S., Liu, Y.L., Gong, P.F., Cao, L., Wang, X.D., Zhao, B., 2017. Macamides present in the commercial maca (*Lepidium meyenii*) products and the macamide biosynthesis affected by postharvest conditions. *Int. J. Food Prop.* 20, 3112–3123. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1274905>.
- Chrikishvili, D., Sadunishvili, T., Zaalishvili, G., 2006. Benzoic acid transformation via conjugation with peptides and final fate of conjugates in higher plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 390–399. <http://doi:10.1016/j.ecoenv.2005.04.009>.
- De Nicola, G.R., Montaut, S., Rollin, P., Nyegue, M., Menut, C., Iori, R., Tatibouët, A., 2012. Stability of benzylic-type isothiocyanates in hydrodistillation-mimicking conditions. *J. Agric. Food Chem.* 61, 137–142. <https://doi.org/10.1021/jf3041534>.
- Esparza, E., Hadzich, A., Kofer, W., Mithöfer, A., Cosio, E.G., 2015. Bioactive Maca (*Lepidium meyenii*) alkaloids are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry* 116, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.030>.
- Fechner, J., Kaufmann, M., Herz, C., Eisenschmidt, D., Lamy, E., Kroh, L.W., Hanschen, F. S., 2018. The major glucosinolate hydrolysis product in rocket (*Eruca sativa* L.), sativin, is 1,3-thiazepane-2-thione: elucidation of structure, bioactivity, and stability compared to other rocket isothiocyanates. *Food Chem.* 261, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.023>.
- Ganzera, M., Zhao, J., Muhammad, I., Khan, I.A., 2002. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 988–991. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.988>.
- Gimsing, A.L., Kirkegaard, J.A., 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Rev.* 8, 299–310. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9105-5>.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 608–613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J., 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>.
- Ibdah, M., Chen, Y.T., Wilkerson, C.G., Pichersky, E., 2009. An aldehyde oxidase in developing seeds of *Arabidopsis* converts benzaldehyde to benzoic acid. *Plant Physiol.* 150, 416–423. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135848>.
- Jeschke, V., Gershenzon, J., Vassao, D.G., 2016. Insect detoxification of glucosinolates and their hydrolysis products. *Adv. Bot. Res.* 80, 199–245. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.003>.
- McCollom, M.M., Villinski, J.R., McPhail, K.L., Craker, L.E., Gafner, S., 2005. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochem. Anal.* 16, 463–469. <https://doi.org/10.1002/pca.871>.
- Matile, P., 1990. The toxic compartment of plant cells. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, pp. 557–566. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2103-0_84.
- Møldrup, M.E., Geu-Flores, F., Olsen, C.E., Halkier, B.A., 2011. Modulation of sulfur metabolism enables efficient glucosinolate engineering. *BMC Biotechnol.* 11, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-12>.
- Palani, K., Harbaum-Playda, B., Meske, D., Keppler, J.K., Bockelmann, W., Heller, K.J., Schwarz, K., 2016. Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chem.* 190, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.012>.
- Platz, S., Kühn, C., Schiess, S., Schreiner, M., Kemper, M., Pivovarova, O., Pfeiffer, A.F. H., Rohn, S., 2015. Bioavailability and metabolism of benzyl glucosinolate in humans consuming Indian cress (*Tropaeolum majus* L.). *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 652–660. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500633>.
- Rabie, M.A., Siliha, H., el-Saidy, S., el-Badawy, A.A., Malcata, F.X., 2011. Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chem.* 129, 1778–1782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.10600>.
- Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, M.C., Fernández, M., Álvarez, M.A., 2013. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chem.* 139, 1029–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>.
- Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Göbel, C., Lerchl, J., Pohnert, G., Feussner, I., 2005. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem.* 280, 7588–7596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411738200>.
- Simons, S.S., Johnson, D.F., 1978. Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: fluorescence properties of 1-alkyl (and aryl)thio-2-alkylisoindoles. *Anal. Biochem.* 90, 705–725. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90163-X12100](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90163-X12100).
- Sørensen, J.C., Frandsen, H.B., Jensen, S.K., Kristensen, N.B., Sørensen, S., Sørensen, H., 2016. Bioavailability and *in vivo* metabolism of intact glucosinolates. *Journal of Functional Foods* 24, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.023>.
- Traka, M.H., 2016. Health benefits of glucosinolates. *Adv. Bot. Res.* 80, 247–279. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.004>.
- Tang, C.S., Bhothipaksa, K., Frank, H.A., 1972. Bacterial degradation of benzyl isothiocyanate. *Appl. Microbiol.* 23, 1145–1148.
- Vaughn, S., Berhow, M., 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind. Crop. Prod.* 21, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.03.004>.
- Wittstock, U., Kurzbach, E., Steiner, A.M., Stauber, E.J., 2016. Glucosinolate breakdown. *Adv. Bot. Res.* 80, 125–169. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.006>.
- Wuensch, C., Lechner, H., Glueck, S.M., Zangger, K., Hall, M., Faber, K., 2013. Asymmetric biocatalytic Cannizzaro-type reaction. *ChemCatChem* 5, 1744–1748. <https://doi.org/10.1002/cctc.201300028>.
- Yábar, E., Pedreschi, R., Chirinos, R., Campos, D., 2011. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chem.* 127, 1576–1583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.021>.
- Zhang, S.Z., Yang, F., Shao, J.L., Pu, H.M., Ruan, Z.Y., Yang, W.L., Li, H., 2020. The metabolic formation profiles of macamides accompanied by the conversion of glucosinolates in maca (*Lepidium meyenii*) during natural air drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* 55, 2428–2440. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14493>.