

Informe técnico final Proyecto GTZ-318.1

Proyecto M.A.C.A.: Metodología Analítica para la Cuantificación de compuestos bio-Activos en *Lepidium meyenii* con el fin de potenciar su oferta para exportación

Responsables: Eric G. Cosio y Eliana Esparza, PUCP, Lima 2010.

1. Resumen

El cultivo y exportación de la maca (*Lepidium meyenii*, Walpers) han tenido un crecimiento acelerado los últimos años debido a su poder energizante y afrodisíaco. Mercados como el norteamericano, el japonés y el europeo, principalmente el alemán, son los principales destinos de la harina de maca y otros productos derivados, y son mercados exigentes en cuanto a sus normas de calidad y a la información que se brinda en la presentación del producto. Es necesario contar con metodología que permita certificar la calidad del producto y garantizar la actividad biológica esperada.

Este proyecto buscó identificar aquellas variedades de maca con mayor contenido de compuestos biológicamente activos mediante el desarrollo de un método de análisis que certifique la composición y actividad biológica del producto de manera que se genere la información necesaria para potenciar el cultivo para exportación, que eventualmente permita el mejor acceso a nuevos mercados o la consolidación en los mercados existentes. Para lograr esto, en una primera etapa del proyecto se obtuvieron distintos compuestos característicos de maca (amidas, aminas, glucosinolatos, isotiocianatos) algunos por síntesis (macamidas), y otros por extracción (glucosinolatos). Al mismo tiempo se desarrollaron distintos métodos analíticos que permitieron la cuantificación de compuestos.

En una segunda etapa, se ensayó la actividad biológica de estos compuestos puros en ratones machos para determinar su actividad biológica y se cuantificaron los compuestos escogidos como indicadores para luego analizar distintas entradas de germoplasma de maca y determinar cuáles son las que poseen mejor actividad biológica y, cuyo cultivo y comercialización debería ser fortalecido frente a otras variedades de menor interés. Sin embargo, se observó que los cambios en los perfiles de productos naturales ocasionados por el procesamiento post-cosecha es más importante que el causado por la variabilidad genética entre las distintas entradas de germoplasma. Esta observación constituye uno de los mayores aportes de este proyecto además de significar un primer paso para ofrecer una certificación de producto que lo garantice frente al mercado mundial y permitir estandarizar procesos de post-cosecha que garanticen la calidad del producto y su actividad biológica.

Palabras Clave: Maca, *Lepidium meyenii*, macamidas, aminas biogénicas, isotiocianatos, ecotipos, certificación.

2. Abreviaturas:

MAO	Monoamino oxidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>)
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin layer chromatography</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografía de gases con espectrometría de masas (<i>Gas chromatography-Mass spectrometry</i>)
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (<i>Fourier Transformed Infrared spectroscopy</i>)
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilurea.
PPy	4-Pirrolidinopiridina
MAC X:N	Macamidas del ácido graso de X carbonos y N insaturaciones
4m-MAC X:N	4-Metoxi-macamidas del ácido graso de X carbonos y N insaturaciones
MAC 16	Macamida de ácido palmítico (C16:0)
MAC 18:2	Macamida del ácido linoléico (C18:2)
AG 18:2	Ácido linoléico
AG 18:3	Ácido linolénico
OPA	o-Ftaldialdehido
ITC	Isotiocianato
BGlu	Bencilglucosinolato
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico
DEAE	dietilaminoetil-celulosa, intercambiador aniónico
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
SAX	Intercambiador aniónico fuerte (<i>strong anion exchanger</i>)
SCX	Intercambiador catiónico fuerte (<i>strong cation exchanger</i>)
RP-18	Cartuchos de extracción en fase sólida en fase reversa con octadecilo ligado.
UV	Ultravioleta
UV-DAD	Detector ultravioleta de arreglo de diodos
TFA	Ácido trifluoro acético
ACN	Acetonitrilo
V _{columna}	Volumen de columna
MSD	Detector de espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry detector</i>)
FID	Detector por ionización de llama (<i>Flame ionization detector</i>)
J	Constante de acoplamiento
Rs	Resolución entre picos
DGlu	Desulfoglucosinolato
DBGlu	Desulfo bencilglucosinolato

BCHO	Benzaldehido
BOH	Bencilalcohol
BCN	Bencilnitrilo
BNH ₂	Bencilamina
4m-BNH ₂	4-Metoxibencilamina
BITC	Bencilisotiocianato
4m-BITC	4-Metoxi-bencilisotiocianato
rpm	Revoluciones por minuto
SPME	Micro-extracción en fase sólida
DVB-PDMS	Divinilbenceno-polidimetilsiloxano
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
CIP	Centro Internacional de la Papa
UPCH	Universidad Peruana Cayetano Heredia
PUCP	Pontificia Universidad Católica del Perú
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
EtOAc	Acetato de etilo
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
EI-MS	Espectrometría de masa por ionización de impacto de electrones.
ESI-MS	Espectrometría de masa por ionización de electrospray
FOB	<i>Free on board</i>
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
DMSO	Dimetil sulfóxido
PM	Peso molecular
M+	Ión molecular
M+Na	Ión que absorbe sodio para ionizar
PDE	Producción diaria de espermatozoides

3. Introducción

3.1. Generalidades del cultivo de maca en el país

Los mercados primarios para la exportación de maca y sus derivados son Japón, Estados Unidos y Alemania, con un crecimiento sostenido de la demanda. Si en el año 2000 se exportaban 95,000 Kg brutos de maca con un valor de exportación de US\$ 1,427,107 (valor FOB), para el año 2006 ya se exportaban 496,537 Kg, con un valor FOB de US\$ 3,772,269, sin embargo esto también significó un descenso en los precios FOB de 15.01 US\$/Kg a 7.60 US\$/Kg. Para el año 2007 ya se cuenta con un total de 316 empresas exportadoras de maca que reportan un valor FOB global de US\$ 4,173,172 y un aumento en el precio FOB a 8.89 US\$/Kg en promedio. Esta disminución en el precio FOB unitario puede deberse al exceso de oferta producto del aumento del número de empresas exportadoras (361 en el 2007) de maca en distintas presentaciones y a que la oferta no necesariamente ofrece una calidad garantizada.

El área potencial para el cultivo de maca abarca casi el 50% del territorio de la meseta del Bombón entre Junín y Pasco. Esta meseta además abarca una de las áreas protegidas reserva de biodiversidad de los andes centrales peruanos, la Reserva Nacional de Junín. La actividad productiva de la maca tiene una baja incidencia sobre la biodiversidad de la Reserva Nacional de Junín, su producción se lleva a cabo en la zona de amortiguamiento, mediante cultivos rotativos, de manera orgánica, sin uso de agentes de control químico, de manera que no ejerce presión negativa sobre las fuentes de agua y las técnicas de cultivo son mayormente tradicionales.

A pesar de que la maca es muy adaptable a las alteraciones por factores ambientales existe el riesgo de que el cultivo pueda ser vulnerable al cambio climático y al agotamiento de las tierras. Actualmente el cultivo no está restringido a Junín y Pasco sino que se produce también en Huancavelica, Apurímac, Puno, Huánuco, Ayacucho, Arequipa, La Libertad, Cajamarca. (Aliaga R., 2007).

La maca (*Lepidium meyenii*, Walpers) es una planta que pertenece a la familia Brassicaceae y crece por encima de los 3,800 metros sobre el nivel del mar, donde son pocas las plantas que realmente pueden soportar los vientos constantes y helados y el gélido e inhóspito clima de la puna (Quiroz y Aliaga, 1997). La domesticación de esta planta se inició hace aproximadamente 2,000 años en la zona de San Blas (Junín) y se limitaba a la zona central de los Andes peruanos. Especial importancia tiene en el cultivo de maca la meseta del Bombón en Junín donde el cultivo tradicional de maca se mantuvo a pesar de los cambios de hábitos alimenticios en la

población rural, la creciente urbanización, a los procesos de migración y al cambio cultural (Aliaga, 2007).

Desde finales de la década del 90 se ha observado un crecimiento en el mercado de exportación de maca debido a la divulgación de sus propiedades energizantes y potenciadoras de la actividad sexual. Con el surgimiento en el Perú de la Iniciativa de Biocomercio se impulsa la revalorización de cultivos tradicionales como rescate de productos de la biodiversidad, como la maca, desde dos puntos de vista: conservación del recurso genético y como factor de desarrollo económico y social de los actores involucrados en su producción.

3.2. Perfil de productos naturales de la maca y sus efectos fisiológicos

Tradicionalmente los hipocotilos de maca son usados en pachamancas o consumidos como carapulcra (hipocotilo seco), además se hacen licores, mayonesa y cocciones diversas, también se hacen mermeladas y jugos. La harina se emplea para hacer pan y galletas. Los hipocotilos tostados se preparan como café o cocoa. Tiene un alto valor alimenticio (Canales y colaboradores, 2000) y se reporta un alto contenido en proteína y fibra, así como hierro, potasio, magnesio. Los ácidos grasos más importantes son el linoléico, linolénico y palmítico. Cabe resaltar la gran concentración de ácido glutámico y aspártico, arginina y leucina (Dini y colaboradores, 1994). Se usa como alimento antianémico, antidepresivo y vigorizante, además, se ha reportado que disminuye los niveles de colesterol (Lobatón, 1998).

Numerosas investigaciones han caracterizado el perfil de metabolitos secundarios de la maca. Se han reportado una variedad de alcaloides, esteroides y/o triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides y/o cumarinas, taninos, glicósidos, saponinas, ácidos grasos libres, aminas secundarias alifáticas y aminas terciarias no caracterizadas, antocianinas y dextrinas (Yllescas, 1994; Garró, 1996; Jeri-Cardinal, 1995; Sandoval y colaboradores, 2001).

Los glucosinolatos son los productos naturales predominantes, entre ellos los más importantes son el 4-metoxi- y el bencilglucosilato. Se ha sugerido, aunque no confirmado, que estos compuestos podrían estar relacionados con una estimulación de la actividad sexual (Li y colaboradores, 2001, Bogani y colaboradores, 2006). En el aceite esencial se puede observar un alto contenido de nitrilos e isotiocianatos. Es interesante la presencia de bencilalcohol y benzaldehído que son posibles precursores de bencilamina. (Tellez y colaboradores, 2002). Todos estos últimos son productos del metabolismo hidrolítico de los glucosinolatos y muy probablemente ocurren durante el procesamiento de los hipocotilos.

Piacente y colaboradores (2002) reportan la presencia, en hipocotilos de maca, del ácido (1R,3S)-1-metiltetrahidro- β -carbolín-3-carboxílico, una

molécula que está presente en el chocolate y la cocoa donde potencia la acción de las aminas inhibiendo la acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO) y actúa como neuromodulador en actividades en el sistema nervioso central (Herraiz, 2000; Rubio y colaboradores, 2007).

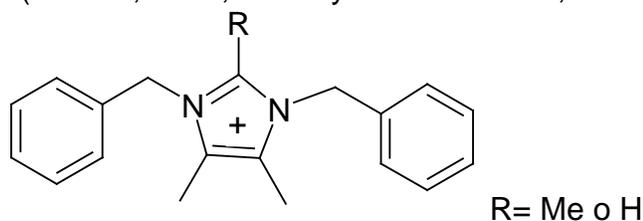


Figura 1: Alcaloide imidazolinico reportado por Cui (2003)

Se ha reportado también la presencia de alcaloides imidazolinicos en maca al igual que en *Lepidium sativum*, al parecer serían derivados de bencilamina, pero no hay estudios sobre su metabolismo o formación. (Cui y colaboradores, 2003)

Propiedades como estimulante sexual de la maca fueron reportadas por Zheng y colaboradores (2000) luego de su administración por vía oral en ratones. El describe por primera vez los compuestos a los que denomina macamidas (bencilamidas de ácidos grasos, estructuras 1,2,3 en la figura 2) (Zheng y colaboradores, 2001). Se muestra que el aumento de la libido y la potencia sexual se incrementa en 2,9 y 4,1 veces con cada una de las composiciones presentadas, además se mejora la función eréctil en ratas con disfunción sexual.

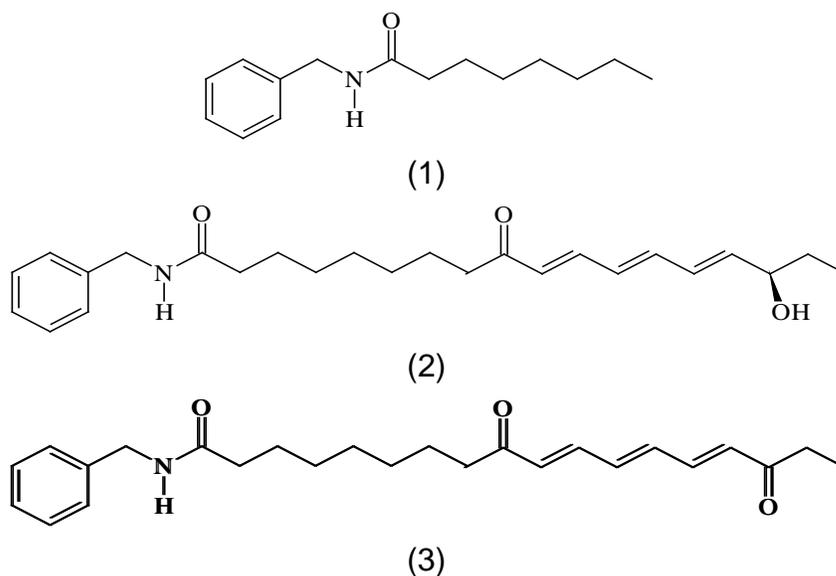


Figura 2: Macamidas reportadas por Zheng y colaboradores (2001)

Posteriores trabajos de Gonzales y colaboradores (2001 a, b) confirman el efecto potenciador de la actividad sexual de la maca en ratas mediante el aumento de la espermatogénesis en su etapa inicial y más tarde lleva su

estudio a humanos donde la producción seminal y la movilidad espermática mejoran por mecanismos no relacionados con factores hormonales.

Sin embargo no se ha experimentado directamente con macamidas sino con extractos enriquecidos, que contienen también esteroides o bencilisotiocianatos (producto de la hidrólisis de glucosinolatos), además de otros compuestos propios de la fracción lipídica de maca. Resulta curioso que la existencia de los mismos glucosinolatos (bencilglucosinolato, 4-hidroxi-BGlu, y 4-metoxi-BGlu) haya sido observada en *Tropaeolum tuberosum* (mashua), la que pareciera tiene un efecto sexual totalmente contrario al de la maca, ya que actúa como un inhibidor sexual (Johns y colaboradores, 1982).

Muhammad reporta el aislamiento de macaridina (1,2-dihidro-N-hidroxipiridina) [4] y otras dos macamidas N-bencil-5-oxo-6E,8E-octadecamida [5] y N-bencilhexadecamida [6], además del ácido 5-oxo-6E,8E-octadecanoico [7], que deja entrever una posible vía octadecanoica de formación de oxilipinas (Estructuras 4,5,6 y 7 en la figura 3) (Muhammad y colaboradores (2002).

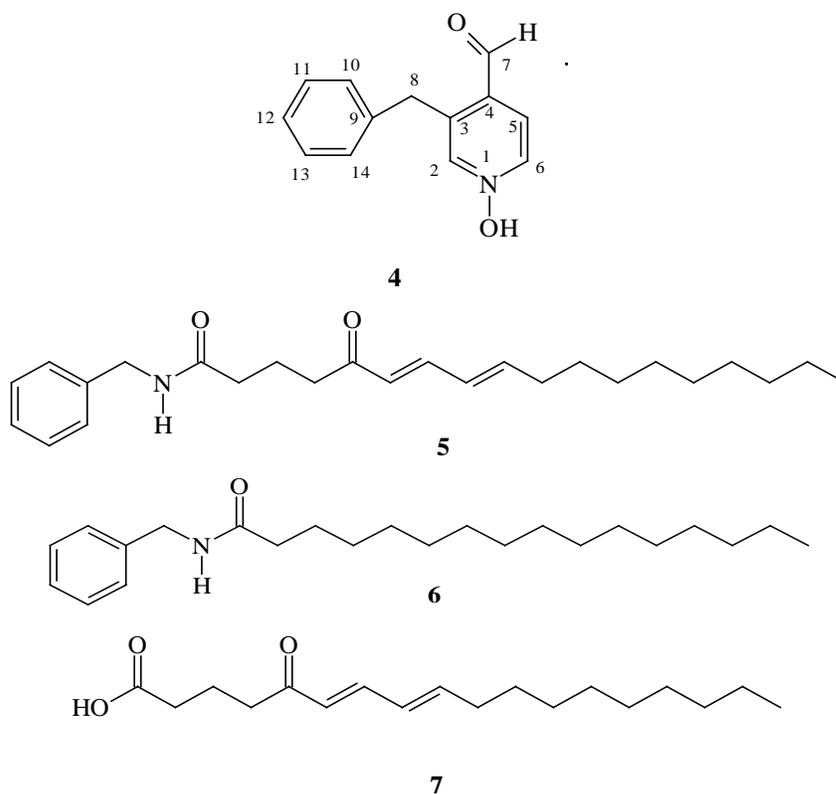


Figura 3: Macamidas reportadas por Muhammad y colaboradores (2002).

Recientemente se han reportado dos alcaloides imidazolinicos adicionales con actividad citotóxica llamados Lepidilinas A y B y que resultaron

positivos a la prueba de Dragendorff para alcaloides (Cui y colaboradores, 2003).

En el año 2002 se publicó un método de HPLC para macamidas y ácidos grasos que dista mucho de ser satisfactorio, por la dificultad para la obtención de algunos de sus estándares y la insuficiente cantidad de picos característicos. (Muhammad y colaboradores, 2002) En el 2005 aparece un método más completo de HPLC que permite determinar un mayor número de macamidas, como estándares, sin embargo se centra solo en ellas como marcadores importantes para el reconocimiento de maca pero no como marcadores de su actividad biológica (McCollom y colaboradores, 2005).

Frente al conocimiento que ya se tiene sobre la maca queda aún pendiente una identificación clara de los compuestos que generan la actividad biológica conocida y el desarrollo de un método que permita cuantificar de manera sencilla estos compuestos. Esta metodología permitiría comparar los distintos eco-tipos de maca, analizar cuáles tienen mayor potencial y también poder evaluar las diferentes fases del proceso productivo y determinar su contribución relativa en el deterioro o mejora de del producto final.

4. Objetivos

Fueron objetivos de este proyecto:

4.1. Objetivo General:

Desarrollar un método cuantitativo de análisis para determinar metabolitos secundarios bio-activos de maca que permita comparar los distintos eco-tipos de maca para potenciar su oferta al mercado internacional

4.2. Objetivos específicos:

- Síntesis y caracterización de amidas de maca
- Bio-ensayo de macamidas, aminos biogénicos, isotiocianatos, nitrilos y glucosinolatos para conocer la actividad biológica en ratones machos.
- Desarrollo de un método cuantitativo para el análisis los compuestos bio-activos indicadores de maca.
- Evaluación de distintas variedades de maca para determinar las de mayor contenido de compuestos bio-activos, y de ser posible, ofrecer una certificación.

4.3. Actualización de los objetivos:

Se eliminó el objetivo de elaboración de cartillas informativas debido al descubrimiento del papel del proceso de secado en la generación de

macamidas. Debe evaluarse en un proyecto separado, y de manera prioritaria, el proceso de secado y su influencia en los niveles de macamidas de manera que se pueda generar cartillas informativas para los productores.

4.4. Valoración del logro del objetivo y de la contribución alemana al mismo:

Este proyecto logra demostrar la importancia del método del procesamiento en la formación de metabolitos secundarios activos. El proyecto desarrolla una metodología que permite analizar maca en diferentes estados de procesamiento o diferentes entradas de germoplasma y que permite sentar las bases para un sistema de calidad de procesamiento y producto final.

La relevancia del secado tradicional en la formación de macamidas es claramente demostrada al analizar estos compuestos siguiendo la metodología desarrollada por este proyecto. Por otro lado es la primera vez que se analiza la actividad biológica de principios activos de maca puros en ratones.

La contribución del fondo Perú Biodiverso ofrecido por GTZ en el marco del Programa de BioComercio fue fundamental para el logro de los objetivos del proyecto pues cubrió la integridad de los gastos de investigación en cuanto a fungibles y representó una ayuda considerable para el pago de Investigadores. Por otro lado, se estableció un rol de talleres dentro del grupo de trabajo GIB que facilitó el intercambio de información entre investigadores y favoreció el contacto con personas vinculadas a Programas de Biocomercio y a la producción.

5. Actividades

5.1. Cumplimiento del cronograma

Tabla 1: Cronograma de actividades planificadas y desarrolladas durante la primera etapa del proyecto

Actividad	Ene	Ene	Feb	Feb	Mar	Mar	Abr	Abr	May	May	Jun	Jun
Lógica	x	x										
Revisión de materiales y reactivos existentes	x	x		x								
Solicitud de presupuestos, compras iniciales	x	x	x	x								
Revisión bibliográfica	x	x		x								
Revisión de amidas sintéticas existentes	x	x		x								
Síntesis y Caracterización			x		x							
Síntesis de Mac16 y Mac 8			X	x		x						
Síntesis de Mac 18				x								
Síntesis de Mac 18:1			X					x		x		
Síntesis de Mac18:2			X	x								
Síntesis de Mac18:3			X					x		x		
Síntesis de 4-metoxi Mac16 y Mac 8			X		x	x		x				
Síntesis de 4-metoxi-Mac 18:1, 18:2 y 18:3					x			x				
Caracterización por IR, RMN, Masas			x		x		x	x		x		X
Purificación			x		x		x					
Purificación de Mac 16 y 8			x	x		x						
Purificación de Mac 18				x		x		x				
Purificación de Mac 18:1, 18:2 y 18:3			x	x	x	x		x				
Purificación de 4-metoxi- Mac16 y Mac8					X			x				
Purificación de 4metoxi-Mac 18:1, 18:2, 18:3					x		x	x				
Ensayos en Ratones							x		x			
Ensayos en Cayetano							x		x	x		x
Reporte de datos									x			x
Análisis de HPLC-MS					x		x		x		x	
Ensayo con compuestos puros					x	x	x	x		x		
Ensayo con mezcla de estándares							x	x		x		x
Búsqueda de sistema adecuado							x		x			x
Análisis de HPLC											x	x
Optimización de extracción											x	x
Optimización de tratamiento previo											x	x
Curvas y cuantificación												x
Otros métodos alternativos											x	
Análisis de GC para amidas								x		x	x	
Análisis de GC para bencilderivados										x		x
Separación de Glucosinolatos										x		
Análisis de HPLC glucosinolatos										x		x
Método de SPE para separación de compuestos												x
Análisis de Resultados												x
Elaboración de Informes											x	x

Tabla 2: Cronograma de actividades planificadas y desarrolladas durante la segunda etapa del proyecto

Actividad	Jul	Jul	Ago	Ago	Sep	Sep	Oct	Oct	Nov	Nov	Dic	Dic	Ene
Ensayos en Ratones				x		x		x		x		x	
Ensayos en Cayetano				x		x		x		x			
Reporte de datos				x		x		x		x			
Análisis de HPLC-MS	x		x		x		x	x		x		x	
Análisis de HPLC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	
Curvas y cuantificación	x	x	x	x		x		x					
Análisis de variedades del CIP			x		x		x	x	x	x		x	
Otros métodos alternativos	x		x		x		x		x				
Análisis de GC para amidas	x	x	x	x	x	x							
Análisis de HPLC glucosinolatos y aminos						x		x		x		x	
Método de SPE para separación de compuestos		x						x		x			
Análisis de Resultados									x	x		x	
Elaboración de Informes		x									x	x	x
Conferencias y publicaciones										x	x	x	x

Nota: las columnas sin sombrear corresponden a las actividades planificadas y las columnas sombreadas corresponden a las actividades desarrolladas.

5.2. Comparación entre metas y logros en las actividades realizadas y los resultados conseguidos:

Tabla 3: Comparación de metas y logros de los objetivos

Objetivo Específico	Meta	Logro
Síntesis, obtención y caracterización de metabolitos secundarios de maca	Obtención de estándares macamidas caracterizados	Se sintetizaron y caracterizaron 12 macamidas diferentes que se utilizaron como estándares para cuantificación e identificación.
Bio-ensayo de macamidas, aminos biogénicos, isotiocianatos, nitrilos y glucosinolatos para conocer la actividad biológica en ratones machos.	Macamidas y bencilos con actividad biológica sobre ratones machos analizada	Se analizaron 6 amidas y 6 grupos bencilados en ratones. Sin embargo aún se siguen realizando pruebas a distintas concentraciones.
Desarrollo de un método cuantitativo que analice los compuestos bio-activos indicadores de maca.	Métodos cuantitativos desarrollados para análisis de macamidas, aminos, glucosinolatos y grupos bencilados	Se desarrolló una metodología de análisis que integraba macamidas, bencilisotiocianato y ácidos grasos insaturados, Bencilamina y bencilglucosinolato, mediante extracción en fase sólida y cromatografía líquida. Por otro lado se experimentó con análisis cromatografía de gases masas para grupos bencilados y también con LC-MS y GC-MS para macamidas.
Análisis de distintas variedades de maca para determinar las de mayor contenido de compuestos bio-activos, y de ser posible, ofrecer una certificación.	Variedades de maca analizadas en el contenido de macamidas, glucosinolatos y bencilamina.	No solo se analizaron distintas entradas de germoplasma sino también se analizó maca secada de manera tradicional versus maca fresca liofilizada y se observó la formación de macamidas producto del proceso de secado tradicional.
Publicación de la investigación en Revistas especializadas	Resultados publicados en revistas o conferencias y cartillas de información desarrolladas para productores y exportadores	Se está escribiendo una primera publicación, y hay otra planificado para más adelante, sin embargo se expuso los resultados preliminares del proyecto en el Simposio "15th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops" en el CIP. La metodología desarrollada forma parte de una tesis de grado. Las cartillas aún no se realizan porque se espera completar la información pendiente de análisis biológicos que tuvieron que reformularse y para poder ofrecer una información más completa (Ver: reformulación de objetivos)

5.3. Modificación de la concepción del proyecto durante la ejecución:

No hubo mayores cambios en la concepción del proyecto, sin embargo, si hubo un vuelco que nos hizo replantear los ensayos biológicos cuando ya el proyecto estaba en un 75%. Las concentraciones de macamidas que estuvimos usando para los ensayos biológicos eran acordes a las concentraciones descritas en la literatura y a las que habíamos observado anteriormente para maca fresca. Sin embargo cuando analizamos maca secada mediante el método tradicional de exposición nos dimos cuenta de que las concentraciones eran casi dos órdenes de magnitud mayores.

5.4. Valoración técnica de la concepción:

La importancia de este proyecto, más allá del logro de las metas propuestas, es que sienta las bases para un sistema de normalización para la industria exportadora de maca y va a robustecer los sistemas de calidad a nivel industrial. Principalmente, se ha determinado la importancia del proceso de secado en la composición química del producto final.

5.5. Continuación al término de la promoción:

Este proyecto ha permitido el trabajo conjunto del grupo de investigación del Laboratorio de Bioanalítica de la PUCP, en colaboración con el laboratorio de Endocrinología del Instituto de la Altura de la Universidad Cayetano Heredia del Dr. Gustavo Gonzales, y con el Dr. Carlos Arbizu del Centro Internacional de la Papa.

Si bien se ha avanzado mucho en nuestro conocimiento de los procesos metabólicos que favorecen la aparición de macamidas queda aún pendiente el tema de cuáles son los factores reales que favorecen su formación y un estudio completo de sus propiedades biológicas, que se sigue realizando en colaboración con la UPCH. Se ha planificado desde ya, con ayuda del CIP, un estudio de cinética de aparición de metabolitos secundarios durante distintas etapas del proceso de secado natural y se desea también comparar otros procesos utilizados por la industria para producir la maca que se comercializa actualmente. Un conocimiento claro de los procesos involucrados es esencial para lograr homogeneidad y calidad en el material para exportación. No se disponía de esta información hasta el desarrollo de este proyecto.

También se ha presentado los resultados de este proyecto en un seminario en el Instituto Max Planck de Ecología Química de Jena en enero del 2010 y existe la posibilidad de realizar estudios de manera conjunta.

5.6. Comentarios

Existieron problemas logísticos que demoraron el desarrollo normal del proyecto. La demora de los proveedores puede en algunos casos llegar a los dos meses o más para la entrega del material necesario para la

investigación, sobre todo en los casos en los que se depende de la importación del material. Por otro lado se presentaron problemas no esperados con equipos como el GC-MS que se tuvo operativo a fines de mayo pero sufrió un desperfecto más tarde, hasta que después de julio quedó operativo.

Los ensayos biológicos se están llevando a cabo nuevamente con concentraciones mayores a las que usamos originalmente ya que descubrimos que la maca seca contiene cantidades superiores de los metabolitos de interés (primariamente macamidas) que la maca fresca utilizada como referencia.

6. Metodología

6.1. Síntesis de amidas (Obtención de estándares)

Se hace reaccionar 1 mmol de ácido graso, 0.5mmol de catalizador de 4-pirrolidino-piridina (PPy) y 1.5 mmol de bencilamina en 10mL de CH_2Cl_2 bajo agitación constante a 0°C , usando 1.0 mmol de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como promotor de la reacción disuelto en 5mL de CH_2Cl_2 el cual se agrega lentamente a la mezcla anterior. La reacción se sigue mediante TLC en placas de 10cm que se corren en CH_2Cl_2 como fase móvil.

6.2. Pre-purificación y purificación de amidas

Se filtra la mezcla de reacción con filtros GF-A. El filtrado se pasa a una pera de decantación y se extrae la solución obtenida con 25 mL de NaOH al 10% para eliminar el ácido graso libre. Se desecha la fase acuosa y se recupera la fase de diclorometano. Se repite esta operación 3 veces con NaOH (10%) y una con agua MilliQ para lavar residuos. Luego se extrae con 25 mL de HCl al 10%, para extraer la amina y la pirrolidinopiridina. Se realiza esta operación 3 veces con HCl 10% y una de agua MilliQ. Se seca lo obtenido en un matraz limpio agregando una cucharadita de sulfato de sodio anhidro para eliminar humedad. Se guarda a -20°C bajo gas nitrógeno.

Para la purificación se filtra la muestra con filtros GF-A, se lava con 5 mL de CH_2Cl_2 , y se agrega la mitad del volumen de hexano. Se empaca una columna de 10cm x 1cm de diámetro con 4 g de sílica gel 60 activado térmicamente ($V_{\text{col}}= 8\text{mL}$). Se acondiciona con 10 mL de CH_2Cl_2 :hexano (2:1) y se carga la muestra en la columna por gravedad, se lava la columna con 4 mL adicionales de CH_2Cl_2 :hexano (2:1). Se eluye las impurezas mas apolares agregando a la columna 8 mL de CH_2Cl_2 :hexano (3:1). Se colectan fracciones de 2 mL en tubos y se sigue la purificación por TLC con placas de 5x10 cm, las cuales se corren en CH_2Cl_2 como fase

móvil y se observan con luz UV de 254nm. Se eluye la amida con CH₂Cl₂ hasta que las placas de TLC indiquen la presencia de la amida libre de impurezas. Se agrega 8 mL de CH₂Cl₂:acetato de etilo (4:1), se sigue recibiendo las fracciones hasta que no se observe la presencia de amida o esté mezclada con impurezas mas polares. Finalmente, se colectan las fracciones puras en un balón previamente pesado, se les evapora a sequedad y se guardan en refrigerador a -20°C bajo gas nitrógeno.

6.3. Caracterización de macamidas

6.3.1. Espectrometría RMN

Se utilizó un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker 300 Ultrashielded. Se realizó experimentos de ¹H y ¹³C.

6.3.2. Espectroscopía FT-IR

Se utilizó un equipo Perkin Elmer FT-IR Serie 1600 trasformada de Fourier. Se analizó las muestras en pastillas de KBr, para los sólidos, y en celdas de NaCl, para los líquidos.

6.3.3. GC-MS

Se utilizó un equipo GC-MS Hewlett Packard 5890 Serie II, detector MSD HP 5971A con ionización por impacto de electrones (energía de ionización: 70 eV).

6.3.4. Espectrofotometría UV

Se tomaron los espectros ultravioleta del pico característico para cada compuesto analizado por HPLC utilizando un detector Merck-Hitachi L-7450-A. Los espectros de fracciones de columna de intercambio aniónico se tomaron en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6 de Thermo Scientific y se utilizaron celdas de cuarzo de 1.5 mL.

6.4. Material vegetal

Inicialmente para ensayos comparativos se utilizaron muestras obtenidas en mercados de Lima y Huancayo. Posteriormente, se analizaron entradas de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP).

La maca fresca fue adquirida en un mercado de Lima, seleccionada para que no tuviera hongos y sus raíces estuvieran intactas. Los hipocotilos fueron seccionados directamente sobre nitrógeno líquido e inmediatamente liofilizados por 3 días. Se les almacenó a -20°C hasta el momento de su análisis.

La maca seca, secada de manera tradicional por los mismos productores, fue adquirida en un mercado de la ciudad de Huancayo y una parte fue molida en un molino de bolas perteneciente a la Universidad Nacional del

Centro. Ambas (entera y molida) fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis.



Figura 4: Maca seca comprada en el mercado de la ciudad de Huancayo y maca fresca comprada en la ciudad de Lima.

Las muestras frescas recibidas del CIP permanecieron 3 días después de ser cultivadas a 4°C después de lo cual fueron limpiadas, cortadas directamente sobre nitrógeno líquido y liofilizadas durante 3 días. Se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Estas muestras fueron pulverizadas en una licuadora Oster inmediatamente antes del análisis. Las entradas de germoplasma analizadas corresponden a los accesos JTA 192, JTA193, JTA85, JTA86, JTA138, JTA125, JTA 127. Las muestras secas (de las mismas entradas) provenientes del CIP fueron secadas durante 2 meses en el campo al aire libre expuestas a la radiación solar directa. Una vez recibidas del CIP se les seccionó y pulverizó en una licuadora Oster y fueron analizadas inmediatamente.



Figura 5: Fotografías de algunas de las entradas de maca del banco de germoplasma del CIP

6.5. Extracción de muestras de maca

Se pesa 1 g de maca, se agrega 20mL de 70%MeOH pre-calentado a 70°C y se agita por 1 hora a 70°C . Se deja enfriar por 15 minutos y se filtra al vacío con filtros Whatman GF/A. Se recoge en tubos de 50mL con tapa rosca, se burbujan con nitrógeno y se almacenan a -20°C . De esta

solución stock se parte para los análisis siguientes. La extracción se realizó por triplicado.

6.6. Análisis de macamidas por HPLC

Preparación de muestra: Se acondiciona un cartucho SPE de 500mg de fase reversa RP-18 con 5mL de MeOH, 5mL de agua, 5mL de 50% MeOH. Se toman 5mL de muestra (en 70% MeOH) y se diluyen a 50% MeOH agregando 2mL de agua MilliQ. Se carga los 7 ml al cartucho SPE, se lava con 2 mL de 50% MeOH y se eluye con 2 ml de 100% MeOH.

Condiciones cromatográficas:

Equipo: Merck - Hitachi LaChrom D-7000
Columna: LiChrospher 100 RP-18, 250mm x 4mm (5 μ m)
Temperatura: 40°C
Detector: UV, arreglo de diodos, Merck-Hitachi L-7450-A
Monitoreo: 210nm
Flujo: 1mL/min
Inyección: 20 μ l
Gradiente:

t	%H ₂ O*	%MeOH*	%ACN*
0	33	2	65
4	33	2	65
6	14	1	85
26	0	0	100
31	0	0	100

*Nota: Todos los solventes contienen 0.005% de TFA

6.7. Análisis de macamidas por GC-MS

Preparación de muestra: 1mL de muestra en 100% MeOH (fracción retenida en RP-18, sección 6.6) se evapora a sequedad bajo flujo de nitrógeno y se resuspende en 200 μ l CH₂Cl₂.

Condiciones cromatográficas:

Equipo: Hewlett Packard. HP 5890 Series II
Columna: Columna capilar Phenomenex Zebron ZB-5ms, (5%-fenil)-metilpolisiloxano, 30m x 0.25mm, espesor de película 0.25 μ m,
T. del inyector: 250°C
T. del detector (FID): 320°C
Voltaje de Ionización: 70eV
Detector MS: MSD HP 5971A
Flujo de He: 0.9 mL/min
Split: 1/20
Programa de temperatura:

40°C	1min
40-320°C	30°C/min
320°C	10°C/min

6.8. Análisis de glucosinolatos por el método de desulfoglucosinolatos

Preparación de sulfatasa: Se prepara 0,5g de enzima sulfatasa (EC. 3.1.6.1) de Sigma en 15mL de agua MilliQ, a continuación se añade 15mL de etanol, se centrifuga a 3000 x g durante aproximadamente 20 minutos a 20°C, se descarta el precipitado y se colecta el sobrenadante aproximadamente 25mL. A este se le añade 44 mL de etanol, se centrifuga a las mismas condiciones, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 9mL de agua. Se divide en tubos Eppendorf de 1mL, se congelan y se guardan a -20°C.

Preparación de muestra: Se acondicionan cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de intercambiador aniónico fuerte (SAX) de 500mg, con 2 mL de 67%MeOH y se agregó el volumen deseado de muestra (2mL) a cada cartucho. Se lava con 2mL de 67% de MeOH y 3mL de agua.

Se acondiciona nuevamente el cartucho con 1mL de buffer MES 0,02M (pH 5,2) y se agrega 150µl de la solución preparada de sulfatasa, excepto el que es utilizado como blanco. Se tapa los cartuchos y se deja actuar a la enzima toda la noche. Al día siguiente se eluye con 800µl de EtOH 60% y 800µl de agua MilliQ que se reciben en el mismo vial para analizar directamente en HPLC.

Condiciones cromatográficas:

Equipo:	Merck - Hitachi LaChrom D-7000.	
Columna:	LiChrospher 100 RP-18, 25mm x 4mm (5µm).	
Temperatura:	30°C.	
Flujo:	1mL/min	
Inyección:	20µl.	
Detección:	254nm (UV).	
Solvente A:	ACN.	
Solvente B:	Agua	
Gradiente:	2 a 5% A	6 minutos
	5 a 7% A	2 minutos
	7 a 21% A	10 minutos
	21 a 29% A	5 minutos
	29 a 100% A	2 minutos
	100% A	2 minutos
	2% A	5 minutos
	2% A	5 minutos

6.9. Análisis de aminas libres (bencilamina) por el método de derivatización con o-ftaldialdehído (OPA)

Preparación del reactivo OPA:

- 27 mg de o-ftaldialdehído
- 0.5 mL etanol
- 5 mL buffer borato de sodio 0.4M pH 9.5
- 25µl mercaptoetanol

Cada semana se adiciona 10µl de mercaptoetanol para mantener en óptimas condiciones el reactivo.

Derivatización: Se utilizó derivatización pre-columna con o-ftaldialdehído (OPA)

- 250µl de buffer borato de sodio 0.4M pH 9.5
- 200µl de muestra directa
- 50 µl de reactivo OPA

Se agita en un vórtex y se deja reaccionar a temperatura ambiente por 3 minutos en total. Se inyecta inmediatamente después.

Condiciones cromatográficas:

Equipo:	Merck - Hitachi LaChrom D-7000.	
Columna:	LiChrospher 100 RP-18, 125mm x 4mm (5µm).	
Temperatura:	30°C.	
Inyección:	50µl.	
Flujo:	1mL/min	
Detección:	340nm (UV).	
Solvente A:	MeOH.	
Solvente B:	Buffer Acetato de sodio 20mM, pH 6.0	
Gradiente:	40-100% A	9 minutos
	100% A	4 minutos
	100-40%A	4 minutos
	40%A	1 minutos

6.10. Análisis de compuestos bencil-derivados por cromatografía de gases

6.10.1. Condiciones de SPME:

Se deja acondicionar la muestra en polvo en un vial de 4mL cerrado durante 30 minutos a 30°C en un bloque termostatzado y se expone la fibra de DVB-PDMS al espacio de cabeza (headspace) del vial durante 30 minutos, después se desorbe exponiendo la fibra en el inyector durante los 5 primeros minutos de la corrida de GC.

6.10.2. Condiciones de GC-MS:

Equipo: Hewlett Packard. HP 5890 Series II
Columna: Columna capilar Phenomenex Zebron ZB-5ms,
(5%-fenil)-metilpolisiloxano 30m x 0.25mm,
espesor de película 0.25µm
T. del inyector 250°C
T. de detector (FID) 250°C
Ionización: 70 eV.
Detector MS: MSD HP 5971A
Flujo de He: 0.9 mL/min
Split: 1/20
Programa de temperatura:
70°C 1min
70-220°C 40°C/min
220°C 5°C/min

6.10.3. Condiciones de GC:

Equipo: Perkin Elmer AutoSystem.
Columna: Columna capilar J&W Scientific, DB-225 (50%-
cianopropilfenil)-metilpolisiloxano, 30m x
0.32mm, espesor de película 0.25µm
T. del inyector : 250°C
T. de detector (FID): 250°C
Flujo de He: 1mL/min
Inyección: 1µl
Split: 1/20
Programa de temperatura:
70°C 1min
70-220°C 40°C/min
220°C 5°C/min

6.11. Análisis de LC-MS para macamidas

Se siguió el mismo sistema que en el punto 6.6 cambiando de equipo HPLC por un Agilent 1200 con detector ESI-MS (Bruker).

6.11.1. Condiciones cromatográficas:

Equipo: Agilent 1200
Columna: LiChrospher 100 RP-18, 250mm x 4mm (5µm)
Temperatura: 40°C
Detector: Bruker Esquire 6000, ion trap ESI-MS
Ionización: 4500V
P. nebulizador: 720 psi
Flujo de N₂: 12 L/min
T nebulizador: 365°C
Monitoreo: 50-500 m/z
Flujo: 1mL/min
Inyección: 2µl para maca seca, 4 para maca fresca

Gradiente:

t	%H ₂ O*	%MeOH*	%ACN*
0	33	2	65
4	33	2	65
6	14	1	85
26	0	0	100
31	0	0	100

*Nota: Todos los solventes contienen 0.005% de TFA

6.12. Análisis de glucosinolatos por LC-MS

Se siguió el método de desulfo glucosinolatos utilizado en 6.8 usando el equipo de LC-MS.

6.12.1. Condiciones cromatográficas:

Equipo:	Merck - Hitachi LaChrom D-7000.	
Columna:	LiChrospher 100 RP-18, 25mm x 4mm (5µm).	
Temperatura:	30°C.	
Flujo:	1mL/min	
Inyección:	2 o 4µl.	
Detección:	ESI-MS	
Detector:	Bruker Esquire 6000 ion trap ESI-MS	
Ionización:	4500 V	
P. nebulizador:	720 psi	
Flujo de N ₂ :	12 L/min	
T nebulizador:	365°C	
Solvente A:	ACN.	
Solvente B:	Agua	
Gradiente:	2 a 5% A	6 minutos
	5 a 7% A	2 minutos
	7 a 21% A	10 minutos
	21 a 29% A	5 minutos
	29 a 100% A	2 minutos
	100% A	2 minutos
	2% A	5 minutos
	2% A	5 minutos

6.13. Elección de la secuencia analítica

6.13.1. Extracción secuencial en fase sólida

Se plantea un esquema secuencial de extracción en fase sólida y cromatografía para analizar los distintos compuestos. Se toma 1g de maca y se extrae como se mencionó en la sección 6.5. De la solución stock se toman 5mL de extracto en MeOH al 70% y se diluyen con 2mL de agua para obtener una solución al 50%. Ésta se carga inicialmente en un cartucho SPE SAX para retener los glucosinolatos y se procede como en

el punto 6.8 para analizar desulfoglucosinolatos por HPLC. El no retenido de esta operación se pasa por un cartucho de SPE de RP-18 y se procede como en el punto 6.6. El no retenido se pasa por un cartucho de SPE SCX para retener aminas. Para dicho efecto se acondicionaba el cartucho con 2mL de 50% MeOH, luego se carga el no retenido del proceso anterior y se lava con 2mL de 70% MeOH y 3mL de agua. Se eluye con 2mL de 3M NH₄OH. Se burbujéa con nitrógeno para eliminar el NH₃. Se analiza este eluato según el método 6.9. La figura 6 muestra de manera esquemática el método propuesto.

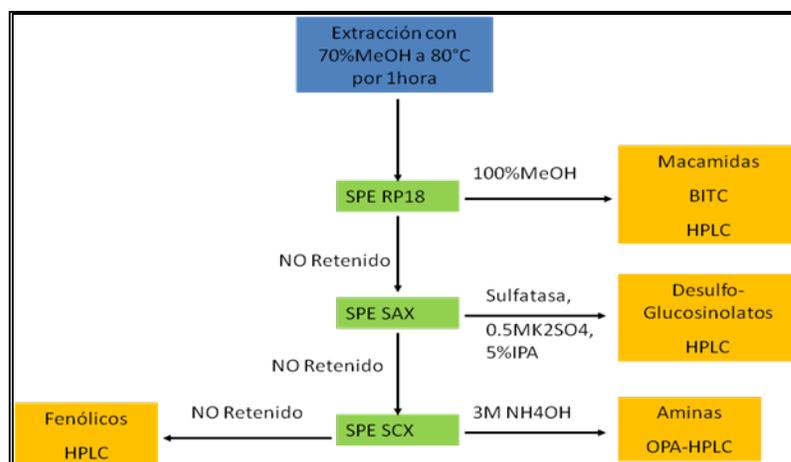


Figura 6: Esquema 1 propuesto en el punto 6.13.1

6.13.2. Extracción secuencial en fase líquida

Un esquema alternativo que se planteó utilizaba extracción líquido-líquido para la separación de macamidas y aminas libres, como bencilamina.

Se extrajo como en el punto 6.5, tomando 5mL de extracto en 70% MeOH al que se diluye con 2mL de agua para obtener una solución al 50%. Ésta se carga en un cartucho SPE SAX para retener los glucosinolatos y se procede como en el punto 6.8 para analizar desulfoglucosinolatos por HPLC. El no retenido de esta operación se rotaevapora hasta dejar solo agua, se acidifica con unas gotas de HCl y se extrae 2 veces con 2mL de EtOAc, se unen las fracciones clorofórmicas y se re-extraen con agua MilliQ. La fracción orgánica contiene las macamidas y el BITC mientras que la fracción acuosa contiene las aminas libres.

La fase orgánica se pasó por un cartucho SPE de sílice (Si60) de 500mg para separar las amidas de los grupos bencilados volátiles. Se tomó 2 mL de muestra, se diluyó con 20mL de hexano y se cargó en el cartucho pre-acondicionado con 5mL de 19:1 hexano: EtOAc y con 5mL de 10:1 Hexano: EtOAc, luego, se lava con 5mL de 10:1 hexano: EtOAc, se juntan el lavado y el no retenido y se guardan a -20°C para análisis por GC de aldehidos volátiles. Se eluye las macamidas con 2mL CH₂Cl₂ y se evapora

a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Se redisuelve en 2mL de MeOH para inyectar a HPLC.

Para preparar las macamidas para HPLC se evapora a sequedad bajo nitrógeno a 30°C y se re-suspende en 2mL de MeOH y se inyecta 20 µl al HPLC según el método 6.6.

Para extraer las aminas de la solución acuosa se lleva a pH básico con unas gotas de NH_{3(cc)} y se re-extrae 2 veces con EtOAc, se colecta la fase orgánica y se extrae con agua para eliminar cualquier impureza. Se evapora a sequedad a 30°C bajo flujo de nitrógeno y se re-suspende en 2mL de buffer borato 0.4 M pH = 9.5. Se analiza según el método 6.9. Todo el proceso se resume en la figura 7.

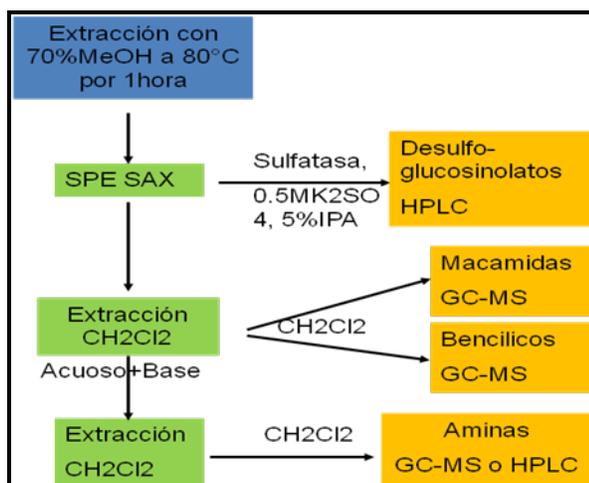


Figura 7: Esquema de análisis planteado en el punto 6.13.2

6.13.3. Extracción en fase sólida en paralelo.

Se toma 1g de maca y se extrae siguiendo el procedimiento de la sección 6.5. De la solución stock se toman 5mL de extracto en MeOH al 70% y se diluyen con 2mL de agua para obtener una solución al 50%. Se pasa por un cartucho de SPE de RP-18 y se procede como en el punto 6.6. y se analizan macamidas, ácidos grasos y BITC por HPLC.

Por otro lado, se carga 2mL del stock en un cartucho de SPE SAX para retener los glucosinolatos y se procede como en el punto 6.8 para analizar desulfoglucosinolatos por HPLC.

La bencilamina se analiza según el método 6.9 usando directamente 200 µl de la solución stock. La figura 8 esquematiza todo el proceso.

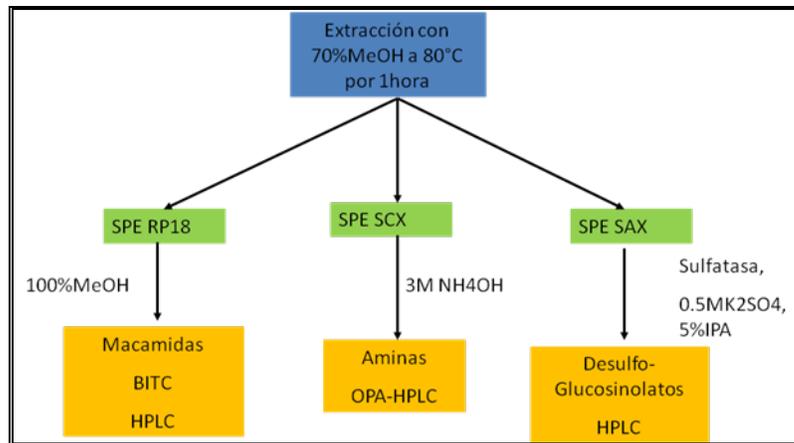


Figura 8: Esquema de análisis planteado en el punto 6.13.3

6.14. Bioensayos

El proceso de la espermatogénesis en el ratón tarda 35 días, es decir el tiempo que transcurre desde que es una célula germinal diploide (espermatogonia) hasta convertirse en un espermatozoide (haploide). Un ciclo espermatogénico dura 12.5 días; Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la UPCH Ha evaluado los efectos tempranos de *Lepidium meyenii* (maca negra) sobre el ciclo espermatogénico en la rata luego de 1, 3, 5, 7 y 12 días de administración (Gonzales y colaboradores, 2006), determinaron que a partir del día 3 de administración de la maca se observa una modificación del ciclo espermatogénico además de un incremento en el conteo de espermatozoides en el conducto deferente y en el epidídimo. Sobre esta base se ha desarrollado un bioensayo con alta sensibilidad y especificidad y que es reproducible tanto en ratones como en ratas. Este bioensayos permite evaluar diferentes compuestos administrados tanto enteral como parenteralmente tratando de determinar su efecto sobre parámetros de función testicular basados en el conteo de espermatozoides en el testículo, epidídimo y conducto deferente. Este procedimiento ha permitido comparar el efecto de extractos hidroalcohólicos atomizados de la maca negra con otros productos naturales o sintéticos.

6.14.1. Animales experimentales

Se utilizaron ratones adultos machos de la cepa Swiss de 2.5 meses de edad con un rango de peso entre 30 – 35 gramos, estos estuvieron mantenidos en número de 5 animales por jaula en un ambiente con una temperatura de 22°C, humedad relativa del 70%, aireación constante, con agua y alimento administrado en forma *ad libitum*. Los animales fueron administrados con diferentes metabolitos de maca, con extracto hidroalcohólico de maca negra y con los correspondientes vehículos durante 3 días continuos por vía oral, así mismo los pesos corporales fueron registrados al inicio de los tratamientos.

Un día después de finalizar los tratamientos los animales fueron sacrificados por exceso de inhalación con eter dietílico, previamente se registró el peso corporal. Se extrajeron los órganos reproductivos entre los que tenemos a los testículos, epidídimos, conducto deferente, vesículas seminales y próstata ventral. Se registró el peso húmedo de ambos testículos y epidídimos así como las vesículas y próstata, posteriormente se procesó el testículo, el epidídimo izquierdo y el conducto deferente para el conteo de espermátides en testículo y conteo de espermatozoides en conducto deferente y epidídimo (Gasco y colaboradores, 2007; Yucra y colaboradores, 2007). Se realizó también el cálculo del tránsito de los espermatozoides desde el testículo hasta el conducto epididimario.

6.14.2. Administración de los metabolitos

Los diferentes metabolitos administrados a los animales fueron macamidas y grupos bencilados, en el siguiente orden:

Tabla 4: Compuestos analizados en ratones

MACAMIDAS	Denominación	PM g/mol	Grado de Pureza (%)	GRUPOS BENCILADOS	Abreviatura	PM g/mol	Grado de Pureza (%)
N-bencil octanamida	Mac 8	233.35	91.7%	bencilisotiocianato	BITC	149.22	98%
4-metoxi-N-bencil octanamida	4m-Mac 8	263.38	94.4%	4-m-bencilisotiocianato	4-m-BITC	179.24	94%
N-bencil hexadecamida	Mac 16	345.56	100%	bencilalcohol	BOH		95%
4-metoxi-N-bencil hexacanamida	4m-Mac 16	375.59	96.5%	bencilaldehido	BCHO		95%
N-bencil octadecanamida	Mac 18	373.62	94.5%	4-metoxi-bencilamina	4m-BNH2	137.18	98%
				bencilamina	BNH2	107.16	99.99%
				bencilnitrito	BCN		95%

Cada uno de ellos fue administrado a los animales vía oral disueltos en DMSO 0.01 % (dimetil sulfóxido) durante 3 días continuos con ayuda de una sonda gástrica No 18, se administró 1.5 ug de macamidas por ratón y 0.01 mg de cada bencilo por ratón, ambos productos sintetizados fueron administrados en 0.5 mL del vehículo.

6.14.3. Grupos controles

Se formaron 2 grupos de 10 animales cada uno para ser evaluados como controles, el primer grupo recibió solo DMSO al 0.01% y el segundo grupo recibió maca negra en forma de extracto hidroalcohólico atomizado (167 mg/kg) disuelto en agua destilada, este segundo grupo se utilizó como control positivo para comparar con los efectos de los diferentes metabolitos.

6.14.4. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad mediante el método de exploración de las variables, determinándose valores de $P > 0.05$, indicando que los datos siguen una curva de distribución normal, luego se realizó la prueba de ANOVA de un factor y se consideró un $P < 0.05$ como significativo respecto al grupo control. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el paquete estadístico SPSS versión 12.0.

7. Resultados

7.1. Síntesis de amidas

La reacción de condensación para la formación de amidas de ácido graso utiliza un promotor de enlace, en este caso es el diciclohexilcarbodiimida (DCC) que se acopla al ácido graso, facilita su unión a la amina generando un mejor grupo saliente y permite la deshidratación para la formación del enlace amida quedando convertido en diciclohexilúrea (DCU) que es insoluble en agua y CH_2Cl_2 y facilita su separación por filtración. El ácido graso se une al promotor que se presenta como mejor grupo saliente frente a un OH y permite la condensación. Sin embargo existe el riesgo de que ocurra una trasposición del acilo al N contiguo en el complejo DCC-Acilo, lo cual inhabilitaría la reacción con la amina. Con el fin de evitar pérdidas por este efecto se utiliza como solvente CH_2Cl_2 y no éter y se utilizan temperaturas bajas (menores a 4°C). Inicialmente se usó un exceso de ácido graso pero es difícil seguir la reacción y la purificación de la amida por TLC porque es complicado ver el ácido graso libre por UV cuando existen cantidades pequeñas de ácido contaminando el compuesto y es difícil de separar por cromatografía de columna ya que eluyen muy cerca. Por lo tanto se utilizó exceso de amina que es más fácil de eliminar en la purificación posterior por columna de sílice.

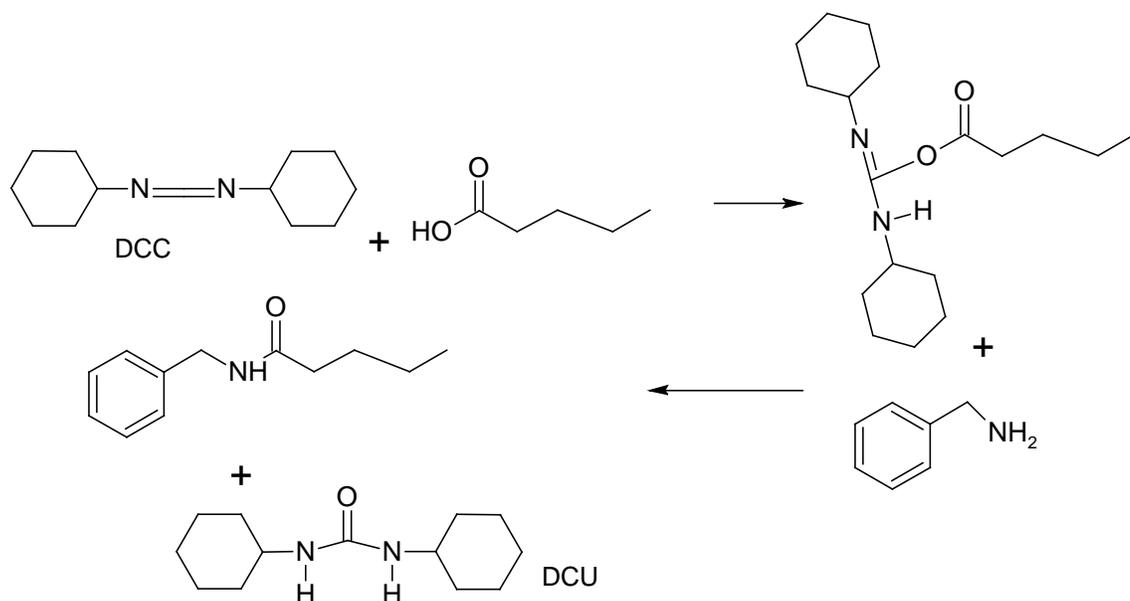


Figura 9: Reacción de condensación promovida por DCC

Se sintetizaron 12 macamidas: 6 bencilamidas de ácidos caprílico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, y linolénico y sus respectivas 4-metoxi-bencilamidas. Para simplificar la nomenclatura se les asignó el código MAC N:X o 4-m-MAC N:X según sean derivadas de la bencilamina o de la 4-metoxi-bencilamina, donde N es el número de carbonos de la cadena del ácido graso y X es el número de insaturaciones presentes en el ácido graso.

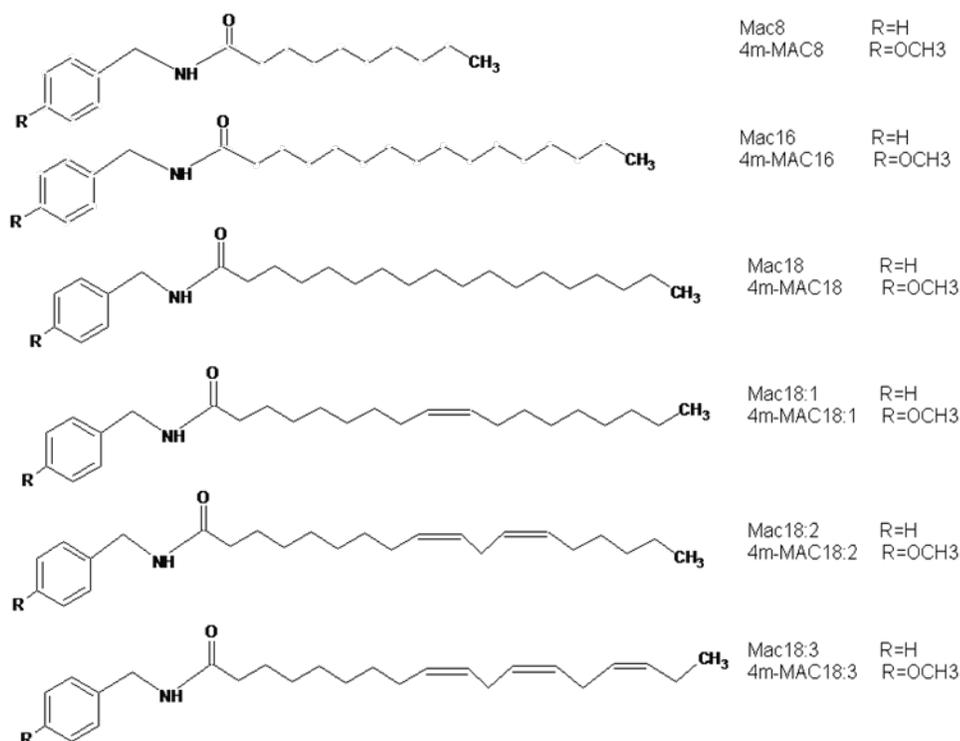


Figura 10: Estructura de las macamidas sintetizadas

7.2. Caracterización de macamidas

MAC 8: N-bencilactanamida (N-bencilamida de ácido caprílico). Sólido blanco cristalino. Fórmula molecular: $C_{15}H_{23}NO$. Peso molecular: 233.35. RMN: $\delta = 2.202$ (t, $J=7.65\text{Hz}$, 2H, $H=2$), $\delta = 1.670$ (m, $J=7.50\text{Hz}$, 2H, $H=3$), $\delta = 1.281$ (s, br, 8H, $H=4-7$), $\delta = 0.872$ (t, $J=6.75\text{Hz}$, 3H, $H=8$), $\delta = 4.437$ (d, $J= 5.70\text{Hz}$, 2H, $H=1'$), $\delta = 7.306$ (m, 5H, $H=3'-7'$), $\delta = 5.856$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3291.67cm^{-1} N-H, 1632.36cm^{-1} C=O, 1553.99cm^{-1} N-C amida, 1452.55cm^{-1} N-C=O, 725.25cm^{-1} amida y 695.65cm^{-1} anillo aromático monosustituido, 2953.46cm^{-1} C-H, 2928.15cm^{-1} C-H, 2915.13cm^{-1} C-H, 2850.05cm^{-1} C-H. EI-MS: $[M^+]=233$, $[C_9H_{11}NO^+]=149$, $[C_7H_8N^+]= 106$, $[C_7H_7^+]= 91$.

MAC 16: N-bencilhexadecanamida (N-bencilamida de ácido palmítico). Sólido blanco cristalino. Fórmula molecular: $C_{23}H_{39}NO$. Peso molecular: 345.56. RMN: $\delta = 2.213$ (t, $J=7.65\text{Hz}$, 2H, $H=2$), $\delta = 1.65$ (t, $J=7.05\text{Hz}$, 2H, $H=3$), $\delta = 1.253$ (s, br, 24H, $H=4-15$), $\delta = 0.88$ (t, $J=6.75\text{Hz}$, 3H, $H=16$), $\delta = 4.437$ (d, $J= 7.65\text{Hz}$, 2H, $H=1'$), $\delta = 7.292$ (m, 5H, $H=3'-7'$), $\delta = 5.852$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3291.55cm^{-1} N-H, 1631.36cm^{-1} C=O amida, 1553.54cm^{-1} N-C amida, 1452.94cm^{-1} N-C=O, 724.05cm^{-1} y 695.78cm^{-1} anillo aromático monosustituido, 2953.33cm^{-1} C-H, 2916.15cm^{-1} C-H, 2847.57cm^{-1} C-H. EI-MS: $[M^+]=345$, $[C_9H_{11}NO^+]=149$, $[C_7H_8N^+]= 106$, $[C_7H_7^+]= 91$.

MAC 18: N-bencilheptadecanamida (N-bencilamida de ácido esteárico) Sólido blanco cristalino. Fórmula molecular: $C_{25}H_{43}NO$. Peso molecular: 373.62. RMN: $\delta = 2.203$ (t, $J= 7.5\text{Hz}$, 2H, $H=2$), $\delta = 1.647$ (m, $J= 6.90\text{Hz}$, 2H, $H=3$), $\delta = 1.255$ (s,br 28H, $H=4-17$), $\delta = 0.881$ (t, $J=6.60\text{Hz}$, 3H, $H=18$), $\delta = 4.440$ (d, $J=5.70\text{Hz}$, 2H, $H=1'$), $\delta = 7.308$ (m, 5H, $H=3'-7'$), $\delta = 5.843$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3293.37cm^{-1} N-H amida, 1631.95cm^{-1} C=O amida, 1553.55cm^{-1} N-C amida, 1462.12cm^{-1} N-C=O, 727.82cm^{-1} y 696.81cm^{-1} anillo

aromático monosustituido, 2951.92 cm^{-1} C-H, 2916.38 cm^{-1} C-H, 2847.63 cm^{-1} C-H. EI-MS: $[\text{M}^+]=373$, $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}^+]=149$, $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}^+]=106$, $[\text{C}_7\text{H}_7^+]=91$.

MAC 18:1: N-bencil-(9Z)-octadecenamida (N-bencilamida de ácido oleico). Líquido a temperatura ambiente. Sólido blanco cristalino a -20°C . Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}$. Peso molecular: 371.60. RMN: $\delta = 2,211$ (t, $J=7,65$ Hz, 2H, $H=2$), $\delta = 1,659$ (m, $J=6,45$ Hz, 2H, $H=3$), $\delta = 1,284$ (s, br, 8H, $H=4-7$), $\delta = 2,047$ (m, $J=3,90$ Hz, 4H, $H=8,11$), $\delta = 5,342$ (m, $J=2,00$ Hz, 2H, $H=9,10$), $\delta = 1,300$ (s, br, 12H, $H=12-17$), $\delta = 0,879$ (t, $J=6,60$ Hz, 3H, $H=18$), $\delta = 4,133$ (q, $J=7,10$ Hz, 2H, $H=1'$), $\delta = 7,319$ (m, 5H, $H=3'-7'$), $\delta = 5,65$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3298.94 cm^{-1} N-H amida, 1639.56 cm^{-1} C=O amida, 3002.10 cm^{-1} C=C-H, 1553.61 cm^{-1} N-C amida, 1463.98 cm^{-1} N-C=O, 725.25 cm^{-1} y 695.65 cm^{-1} anillo aromático monosustituido, 2919.45 cm^{-1} C-H, 2849.40 C-H. EI-MS: $[\text{M}^+]=371$, $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}^+]=149$, $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}^+]=106$, $[\text{C}_7\text{H}_7^+]=91$.

MAC 18:2: N-bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida (N-bencilamida de ácido linoléico). Aceite incoloro. Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{NO}$. Peso molecular: 369.58. RMN: $\delta = 2,211$ (t, $J=7,65$ Hz, 2H, $H=2$), $\delta = 1,658$ (m, $J=7,35$ Hz, 2H, $H=3$), $\delta = 1,312$ (s, br, 14H, $H=4-7, 15-17$), $\delta = 2,036$ (m, $J=6,45$ Hz, 4H, $H=8,14$), $\delta = 5,360$ (m, $J=2,70$ Hz, 4H, $H=9,10,12,13$), $\delta = 2,770$ (t, $J=5,85$ Hz, 2H, $H=11$), $\delta = 0,889$ (t, $J=6,70$ Hz, 3H, $H=18$), $\delta = 4,457$ (d, $J=5,70$ Hz, 2H, $H=1'$), $\delta = 7,319$ (m, 5H, $H=3'-7'$), $\delta = 5,691$ (m, 1H, N-H). FT-IR: 3285.69 cm^{-1} N-H amida, 1645.62 cm^{-1} C=O amida, 1549.64 cm^{-1} N-C amida, 1454.07 cm^{-1} N-C=O, 725.74 cm^{-1} y 697.13 cm^{-1} anillo aromático monosustituido, 3064.23 cm^{-1} y 3008.10 cm^{-1} C=C-H, 2953.68 cm^{-1} C-H, 2926.35 cm^{-1} C-H, 2854.34 cm^{-1} C-H. EI-MS: $[\text{M}^+]=368$, $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}^+]=149$, $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}^+]=106$, $[\text{C}_7\text{H}_7^+]=91$.

MAC 18:3: N-bencil-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida (N-bencilamida de ácido linolénico). Aceite incoloro. Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}$. Peso molecular: 367.57. RMN: $\delta = 2,208$ (t, $J=7,65$ Hz, 2H, $H=2$), $\delta = 1,657$ (m, $J=7,20$ Hz, 2H, $H=3$), $\delta = 1,310$ (s, br, 8H, $H=4-7$), $\delta = 2,077$ (m, $J=7,05$ Hz, 4H, $H=8,17$), $\delta = 5,361$ (m, $J=3$ Hz, 6H, $H=9,10,12,13,15,16$), $\delta = 2,805$ (t, $J=5,85$ Hz, 4H, $H=11, 14$), $\delta = 0,974$ (t, $J=7,5$ Hz, 3H, $H=18$), $\delta = 4,453$ (d, $J=5,70$ Hz, 2H, $H=1'$), $\delta = 7,334$ (m, 5H, $H=3'-7'$), $\delta = 5,715$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3301.84 cm^{-1} N-H amida, 1639.13 cm^{-1} C=O amida, 1551.37 cm^{-1} N-C amida, 1453.88 cm^{-1} N-C=O, 3005.85 cm^{-1} amida, 720.74 cm^{-1} y 696.02 cm^{-1} anillo aromático monosustituido, C=C-H, 2962.02 cm^{-1} C-H, 2918.27 cm^{-1} C-H, 2848.44 cm^{-1} C-H. EI-MS: $[\text{M}^+]=367$, $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}^+]=149$, $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}^+]=106$, $[\text{C}_7\text{H}_7^+]=91$.

4m-MAC 8: 4'-metoxi-N-benciloctanamida (4'-metoxi-N-bencilamida de ácido caprílico). Sólido blanco cristalino. Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_2$. Peso molecular: 263.38. RMN: $\delta = 2,182$ (t, $J=7,65$ Hz, 2H, $H=2$), $\delta = 1,634$ (m, $J=7,50$ Hz, 2H, $H=3$), $\delta = 1,274$ (s, br, 8H, $H=4-7$), $\delta = 0,868$ (t, $J=6,75$ Hz, 3H, $H=8$), $\delta = 4,366$ (d, $J=6,60$ Hz, 2H, $H=1'$), $\delta = 6,86$ (d, $J=6,90$ Hz, 1H, $H=3'$), $\delta = 7,209$ (d, $J=8,70$ Hz, 1H, $4',6'$), $\delta = 6,86$ (d, $J=6,90$ Hz, 1H, $H=7'$), $\delta = 3,789$ (s, 3H, O-Me), $\delta = 5,755$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3289.51 cm^{-1} N-H amida, 1631.67 cm^{-1} C=O amida, 1553.93 cm^{-1} N-C amida, 1463.84 cm^{-1} N-C=O amida, 1514.79 cm^{-1} C=C-O grupo metoxi, 1254.11 cm^{-1} y 1031.86 cm^{-1} C-O grupo metoxi, 815.80 - 810.71 cm^{-1} anillo aromático disustituido en posición *para*, 2916.06 cm^{-1} C-H, 2953.75 cm^{-1} C-H, 2928.95 cm^{-1} C-H, 2850.19 cm^{-1} C-H. EI-MS: $[\text{M}^+]=263$, $[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2^+]=179$, $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}^+]=136$, $[\text{C}_8\text{H}_9\text{O}^+]=121$

4m-MAC 16: 4'-metoxi-N-bencilhexadecanamida (4'-metoxi-N-bencilamida de ácido palmítico). Sólido blanco cristalino. Fórmula molecular: $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_2$. Peso molecular: 375.59. RMN: $\delta = 2,187$ (t, $J=7,50$ Hz, 2H, $H=2$), $\delta = 1,680$ (m, 2H, $H=3$), $\delta = 1,246$ (s, br, 24H, $H=4-15$), $\delta = 0,872$ (t, $J=6,45$ Hz, 3H, $H=16$), $\delta = 4,367$ (d, $J=5,10$ Hz, 2H, $H=1'$), $\delta = 6,866$ (d, $J=8,40$ Hz, 1H, $H=3',7'$), $\delta = 7,207$ (d, $J=8,40$ Hz, 1H, $H=6',7'$), $\delta = 3,787$ (s, 3H, OMe), $\delta = 5,789$ (s, 1H, N-H). FT-IR: 3299.90 cm^{-1} N-H amida, 1639.54 cm^{-1} C=O amida, 1551.58 cm^{-1} N-C amida, 1462.63 cm^{-1} N-C=O amida, 808.23 cm^{-1} anillo

aromático disustituido en posición *para*, 2954.05 cm⁻¹ C-H, 2917.06 cm⁻¹ C-H, 2848.74 cm⁻¹ C-H, 1515.43 cm⁻¹ C=C-O grupo metoxi, 1260.74 cm⁻¹ y 1032.26 cm⁻¹ C-O grupo metoxi. EI-MS: [M⁺]= 375, [C₁₀H₁₃NO₂⁺]= 179, [C₈H₁₀NO⁺]=136, [C₈H₉O⁺] = 121

4m-MAC 18: 4'-metoxi-N-benciloctadecanamida (4'-metoxi-N-bencilamida de ácido esteárico). Sólido blanco cristalino. Fórmula molecular: C₂₆H₄₅NO₂. Peso molecular: 403.64. RMN: δ = 2.192 (t, J=7.65Hz, 2H, H=2), δ = 1.637 (m, J=7.05Hz, 2H, H=3), δ = 1.250 (s,br, 28H, H=4-17), δ = 0.876 (s, J=6.60Hz, 3H, H=18) δ = 4.378 (d, J=5.40Hz, 2H, H=1'), δ = 6.875 (d, J=8.70Hz, 1H, 3', 7'), δ = 7.216 (d, J=8.40Hz, 1H, H=4', 6'), δ = 3.796 (s, 3H, OMe), δ = 5.697 (s), 1H, N-H). FT-IR: 3291.52 cm⁻¹ N-H amida, 1630.05 cm⁻¹ C=O amida, 1554.01 cm⁻¹ N-C amida, 1462.30 cm⁻¹ N-C=O amida, 815.80 – 807.68 cm⁻¹ anillo aromático disustituido en posición *para*, 1514.73 cm⁻¹ C=C-O grupo metoxi, 1254.39 cm⁻¹ y 1029.54 cm⁻¹ C-O grupo metoxi, 2917.05 cm⁻¹ C-H, 2847.86 cm⁻¹ C-H. EI-MS: [M⁺]= 402, [C₁₀H₁₃NO₂⁺]= 179, [C₈H₁₀NO⁺]=136, [C₈H₉O⁺] = 121

4m-MAC 18:1: 4'-metoxi-N-bencil-(9Z)-octadecenamida (4'-metoxi-N-bencilamida de ácido oleico). Líquido a temperatura ambiente. Sólido blanco cristalino a -20°C. Fórmula molecular: C₂₆H₄₃NO₂. Peso molecular: 401.63. RMN: δ = 2,189 (t, J=5,85, 2HH=2), δ = 1,645 (m, J= 7,00Hz, 2H, H=3), δ = 1,293 (s, br, 12H, H=4-7, 12-17)), δ = 1,996 (m, J= 3,90Hz, 4H, H=8, 11), δ = 5,342 (m, J=2,0Hz, 2H, H=9,10), δ = 0,879 (t, J=6,75Hz, 3H, H=18), δ = 4,384 (d, J= 5,70 Hz, 2H, H=1'), δ = 6,88 (d, J= 6,6Hz, 2H, H=3', 7'), δ = 7,214(d, J=4,50Hz, 2H, 4', 6'), δ = 3,800 (s, 3H, OMe), δ = 5,608 (s, 1H, N-H). FT-IR: 3298.94 cm⁻¹ N-H amida, 1639.56 cm⁻¹ C=O amida, 1553.61 cm⁻¹ N-C amida, 1463.98 cm⁻¹ N-C=O amida, 810.11 cm⁻¹ anillo aromático disustituido en posición *para*, 1514.79 cm⁻¹ C=C-O grupo metoxi, 1255.11 cm⁻¹ y 1031.97 cm⁻¹ C-O grupo metoxi, 3002.10 cm⁻¹ C=C-H, 2919.45 cm⁻¹ C-H, 2849.40 C-H. EI-MS: [M⁺]= 400, [C₁₀H₁₃NO₂⁺]= 179, [C₈H₁₀NO⁺]=136, [C₈H₉O⁺] = 121

4m-MAC 18:2: 4'-metoxi-N-bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida (4'-metoxi-N-bencilamida de ácido linoléico). Aceite incoloro. Fórmula molecular: C₂₆H₄₁NO₂. Peso molecular: 399.61. RMN: δ = 2,19 (t, J= 7,65 Hz, 2H, H=2), δ = 1,629 (m, 2H, H=3), δ = 1,307 (s,br, 14H, H=4-7, 15-17), δ = 2,035 (m, J= 6,45Hz, 4H, H=8,14), δ = 5,349 (m), J=2,70 Hz, 4H, H=9,10,12,13), δ = 2,768 (t, J=5,70 Hz, 2H, H=11), δ = 0,888 (t, J= 6,75 Hz, 3H, H=18), δ = 4,384 (d, J=5,70 , 2H, H= 1'), δ = 6,873 (d), J=8,70 Hz, 2H, H=3', 7'), δ = 7,221(d), J= 8,70, 2H, 4', 6'), δ = 3,800 (s, 3H, H=OMe), δ = 5,615 (m, 1H, N-H). FT-IR: 3289.51 cm⁻¹ N-H amida, 1553.93 cm⁻¹ N-C amida, 1631.67 cm⁻¹ C=O amida, 1463.84 cm⁻¹ N-C=O amida, 815.80 - 810.71 cm⁻¹ anillo aromático disustituido en posición *para*, 1514.79 cm⁻¹ C=C-O grupo metoxi, 1254.11 cm⁻¹ y 1031.86 cm⁻¹ C-O grupo metoxi, 3006.43 cm⁻¹ C=C-H, 2916.06 cm⁻¹ C-H, 2953.75 cm⁻¹ C-H, 2928.95 cm⁻¹ C-H, 2850.19cm⁻¹ C-H. EI-MS: [M⁺]= 398, [C₁₀H₁₃NO₂⁺]= 179, [C₈H₁₀NO⁺]=136, [C₈H₉O⁺] = 121

4m-MAC 18:3: 4'- metoxi-N-bencil-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida (4'-metoxi-N-bencilamida de ácido linoléico). Aceite incoloro. Fórmula molecular: C₂₆H₃₉NO₂. Peso molecular: 397.59. RMN: δ = 2,187 (t, J= 7,50Hz, 2H, H=2), δ = 1,644 (m), J=7,20Hz ,2H, H=3), δ = 1,306 (s,br, 8H, H=4-7), δ = 2,054 (m, J=6,15Hz, 4H, H=8,17), δ = 5,369 (m, J=2,70Hz , 6H, H=9,10,12,13,15,16), δ = 2,804 (t, J=5,70 Hz, 4H, H=11,14), δ = 0,973 (t, J=7,50 Hz, 3H, H=18), δ = 4,381(d, J=5,70 Hz, 2H, H=1'), δ = 6,871(d), J=6,6 Hz, 2H, H=3', 7'), δ = 7,219 (d), J= 8,40Hz, 2H, 4', 6'), δ = 3,798 (s, 3H, OMe), δ = 5,627 (s, N-H). FT-IR: 3300.51 cm⁻¹ N-H amida, 1639.31 cm⁻¹ C=O amida, 1552.42 cm⁻¹ N-C amida, 1460.04 cm⁻¹ N-C=O amida, 810.09 cm⁻¹ anillo aromático disustituido en posición *para*, 1513.82 cm⁻¹ C=C-O grupo metoxi, 1254.69 cm⁻¹ y 1031.81 cm⁻¹ C-O grupo metoxi, 3005.83 cm⁻¹ C=C-H, 2916.51 cm⁻¹ C-H, 2848.08 cm⁻¹ C-H. EI-MS: [M⁺]= 396, [C₁₀H₁₃NO₂⁺]= 179, [C₈H₁₀NO⁺]=136, [C₈H₉O⁺] = 121

7.3. Análisis de macamidas por GC-MS

No se ha reportado hasta ahora un método de cromatografía de gases para macamidas porque su alto peso molecular y alto punto de ebullición dificultarían el análisis. Sin embargo obtuvimos un método que separaba las 12 amidas en un tiempo aproximado de 21 minutos, y que nos permitió analizar la pureza de los compuestos y sus respectivos espectros de masas.

Tabla 5: Relación de amidas, sus M⁺ y los patrones de fragmentación ordenador en relación a su abundancia relativa

Datos de la Muestras		Datos de Masas (m/Z)									
ID	PM	M+	Mayoritario		otros						
MAC8	233,35	233	91	149	106	57	176	559			
MAC16	345,56	345	149	91	106	162	55	539	302	260	232
MAC18	373,62	373	149	91	106	162	57	497			
MAC18:1	371,60	371	91	149	106	162	55	69			
MAC18:2	369,58	368	91	106	149	67	162	624	420	298	260
MAC 18:3	367,57	367	91	106	149	79	67	162	55		
4-mMAC8	263,38	263	121	179	136	234	220	106	77	57	91
4-mMAC16	375,59	375	121	179	77	57	248	234	448	561	248
4-mMAC18N	403,64	402	121	179	136	57	77	207	234	282	304
4-mMAC18:1	401,63	400	121	136	178	177	301	122	55	69	67
4-mMAC18:2	399,61	398	121	179	136	67	95	55	163	207	243
4-mMAC18:3	397,59	396	121	136	395	91	79	55	147	179	343

Los fragmentos más comunes para las MAC N:X son m/Z = 149,106, 91 que corresponden a las siguientes estructuras generadas de la fragmentación de las bencilamidas por reordenamiento de McLafferty (m/Z=149) y por ruptura del enlace amida (m/Z=106) o por la separación del grupo bencilo (m/Z=91):

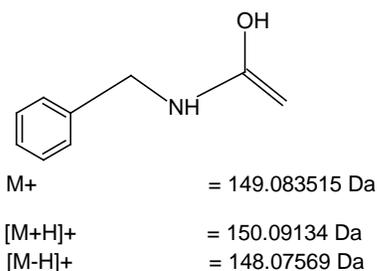


Figura 11: Fragmentación por McLafferty para bencilamidas

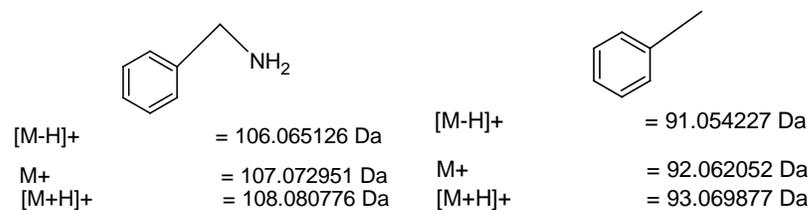


Figura 12: Otros fragmentos importantes para bencilamidas

Para las 4-m-MAC N:X los m/z más importantes son los que corresponden a fragmentos similares a los anteriores agregando el grupo metoxilo en el anillo. Estos fragmentos presentan los valores de m/z= 179,136,121.

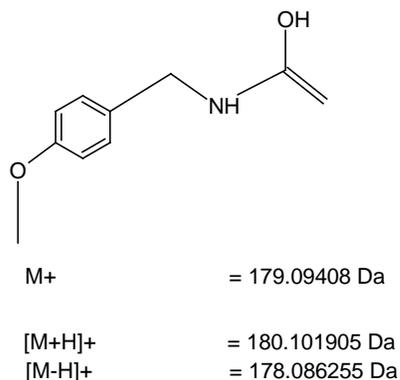


Figura 13: Fragmentación por McLafferty para 4-metoxi-bencilamidas

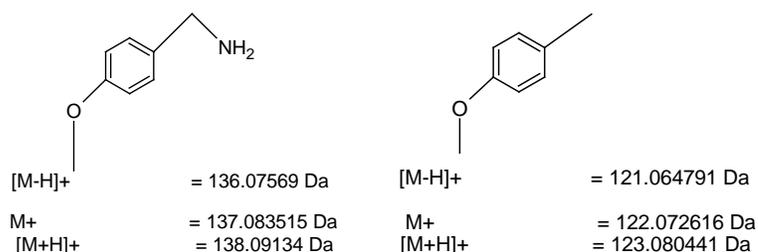


Figura 14: Otros fragmentos importantes para 4-metoxi-bencilamidas

Los patrones de fragmentación por impacto de electrones que se muestran en la tabla 6, son coincidentes con lo esperado para cada compuesto. Este método se utilizó primariamente para caracterización de macamidas.

7.4. Cuantificación de macamidas, ácidos grasos insaturados, bencilisotiocianato, bencilglucosinolato y bencilamina.

7.4.1. Maca fresca liofilizada vs. maca seca tradicional

Las muestras de maca seca tradicional molida y las de maca fresca liofilizada compradas en mercado se analizaron siguiendo el esquema 6.13.3 de la sección anterior.

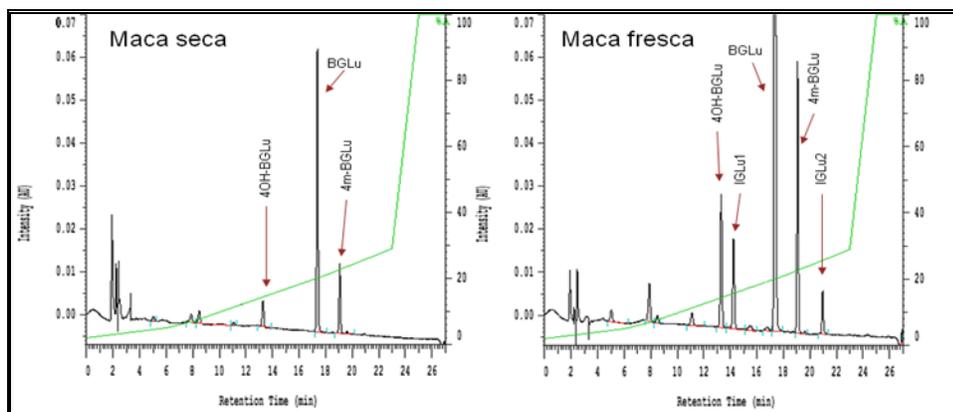


Figura 15: Cromatogramas del método 6.8 en muestras de maca seca molida y maca fresca liofilizada.

En este método el pico preponderante es el de 17.21 minutos que pertenece al desulfo-bencilglucosinolato, pues coincide en tiempo de retención y espectro ultravioleta con los estándares de desulfo-bencilglucosinolato, reportados en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Geu, 2005).

Para los demás picos se analizaron los espectros ultravioleta y se compararon con los obtenidos en el Instituto de Química Ecológica del Max Planck Institute en Jena a partir de estándares.

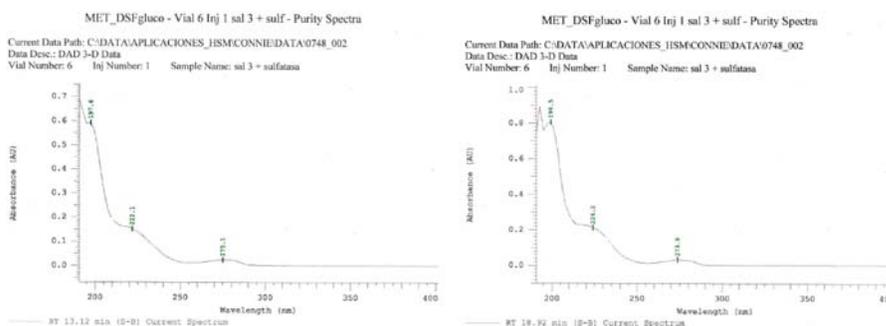


Figura 16: UV de los pico en 13.12 min y 18.92 min similar al hidrox- y al metoxi- desulfo bencilglucosinolato**

Los picos que aparecen en 14.08 y 20.83 minutos aparecen en maca fresca pero no en maca seca. Los espectros ultravioleta coinciden con los espectros del 4-hidroxi-indol-3-yl- desulfo-metilglucosinolato y el 4-metoxi-indol-3-yl- desulfo-metilglucosinolato**.

(**Por comparación con espectros UV obtenidos de estándares del Instituto Max Plank de Ecología Química en Jena, Alemania)

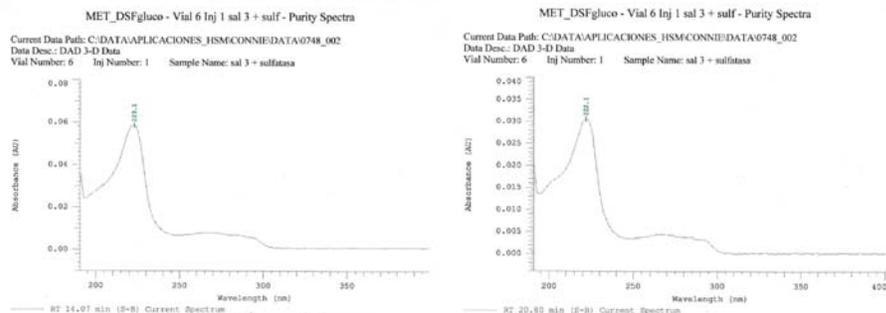


Figura 17: UV del pico en 14.07 min y 20.80 min pertenecientes a desulfoglucosinolatos indólicos

Para confirmar esta sospecha se corrió el mismo sistema en LC-MS con la misma columna y las mismas condiciones del método 6.8, las condiciones del ESI-MS se dan en el método 6.12.

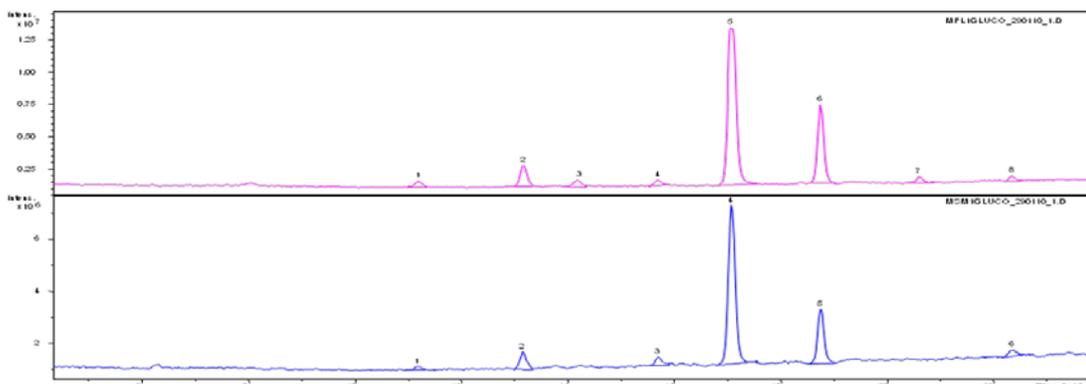


Figura 18: Cromatograma en LC-MS de Maca fresca liofilizada (MFL) vs Maca seca molida (MSM) se analizaron los picos que coinciden con el cromatograma detectado en UV.

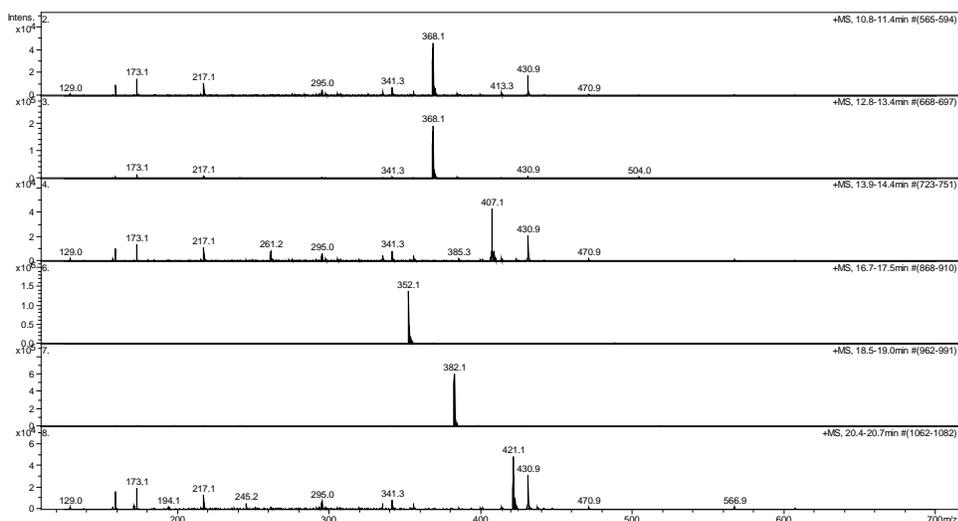


Figura 19: Espectros de masas del cromatograma de MFL.

Se confirmó la presencia del bencildesulfoglucosinolato en 17.2 mediante su espectro de masa (ESI-MS), $M+Na = 352.1$. Se observó que todos ionizaban absorbiendo sodio. Esto es probable porque el sistema es mayormente acuoso y no contiene ácido que ayude a la ionización.

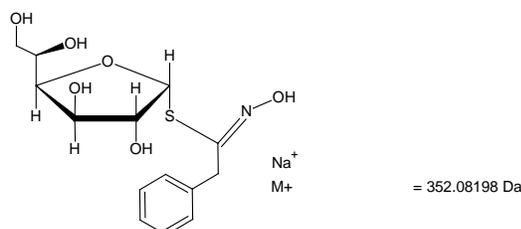


Figura 20: Estructura del desulfo-bencilglucosinolato ($M+Na$)

Los picos de 11 y 13 minutos coinciden en masa molecular ($M+Na=368.1$). Esta masa corresponde al hidroxibencil-desulfo-glucosinolato. La diferencia sería en la posición del grupo hidroxilo, porque se sabe que maca contiene 4-hidroxi- y 3-hidroxi- bencilglucosinolato. (Li, Ammerman y Quiroz, 2001).

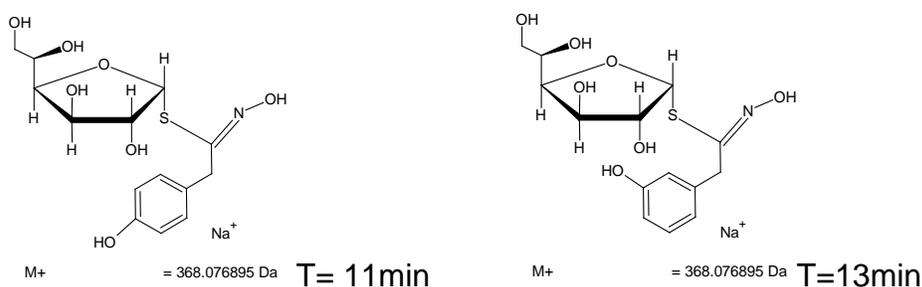


Figura 21: Estructuras propuestas para los picos de 11 y 13 minutos en el método de desulfoglucosinolatos correspondientes al 4-hidroxi y 3hidroxiglucosinolato.

Se inyectó 4-hidroxi-desulfobencilglucosinolato estándar para confirmar esta suposición y coincidió con el pico de 11 minutos. Por lo tanto, el de 13 minutos pertenecería al isómero estructural en meta. El espectro del pico de 19 minutos que se presume 4-metoxi bencil-desulfo-glucosinolato (Figura 22) tiene un espectro de ESI-MS que tiene $M+Na = 382.1$ que coincide con lo esperado.

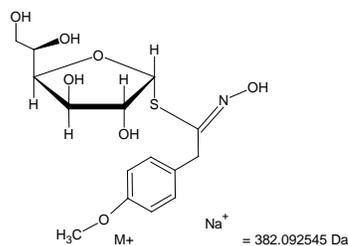


Figura 22: Estructura del desulfo 4metoxi bencilglucosinolato

Los picos que aparecen en los minutos 14 y 20 y de los que se sospecha que sean glucosinolatos indólicos, presentan $M+Na = 407$ y 421 . Se propuso las siguientes estructuras que coinciden con sus masas y sus UVs. (Figura 23)

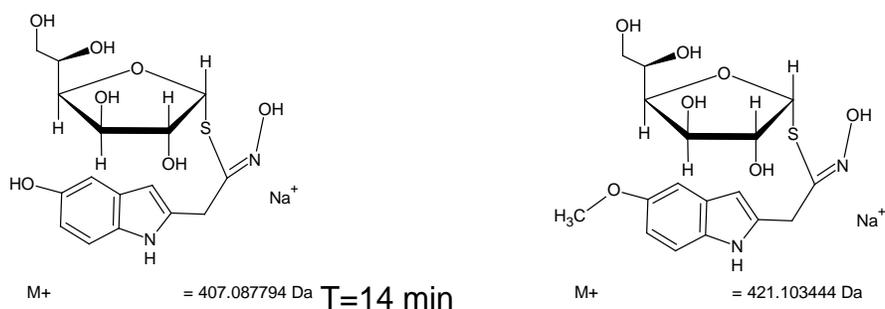


Figura 23: Estructuras propuestas para los picos 14 y 20 minutos y que corresponden a dos glucosinolatos indólicos.

Sin embargo, la observación más importante es la desaparición notable de benzilglucosinato con el proceso de secado. De igual manera, cuando se analizó benzilamina se observó, como era de esperarse, un incremento en la cantidad de benzilamina formada durante el proceso de secado.

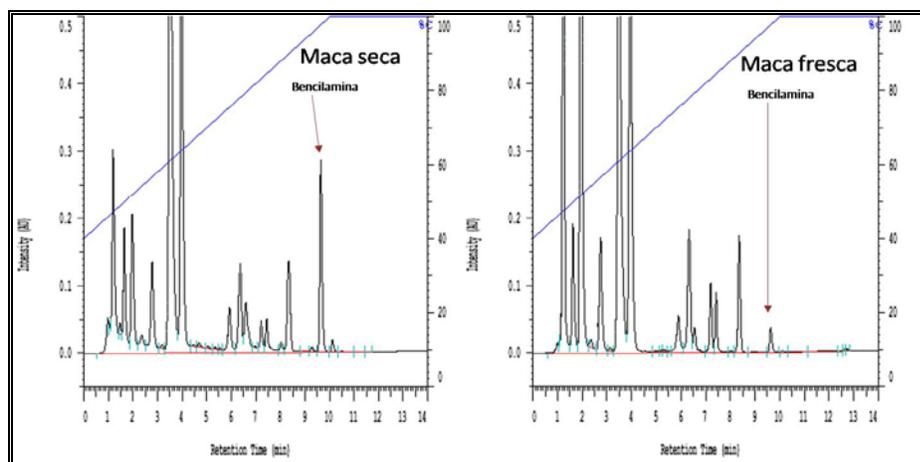


Figura 24: Comparación del contenido de benzilamina en maca seca molida (MSM) versus maca fresca liofilizada (MFL)

Sin embargo al analizar macamidas, ácidos grasos insaturados libres y BITC, inesperadamente, se observó un incremento notable en el contenido de macamidas. Esto cambia radicalmente el sentido del proceso de secado, que originalmente se relacionaba a hidrólisis de glucosinolatos y procesos hidrolíticos asociados a ruptura celular, y se presenta como un proceso fundamental para la formación de amidas.

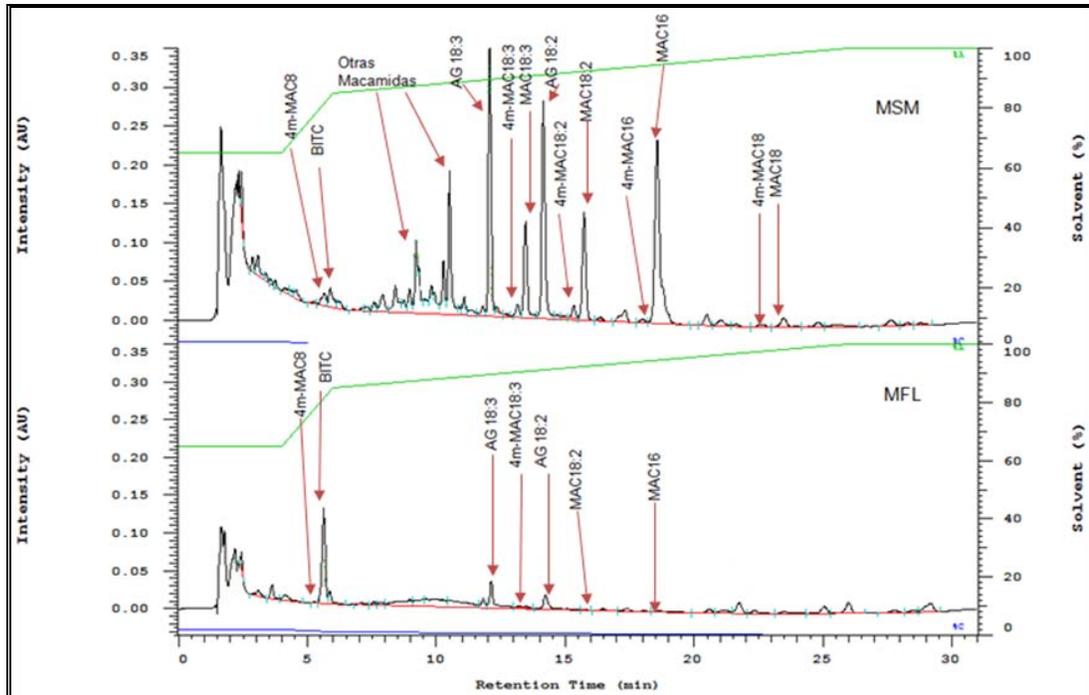


Figura 25: Comparación del contenido de macamidas, ácidos grasos y BITC en maca seca molida (MSM) versus maca fresca liofilizada (MFL)

Si bien en maca fresca se observan picos que coinciden con los tiempos de retención de macamidas, no es posible su identificación por UV. Con el fin de conocer si realmente hay amidas en maca fresca se optó por analizar las muestras de maca fresca mediante LC-MS para confirmar su presencia.

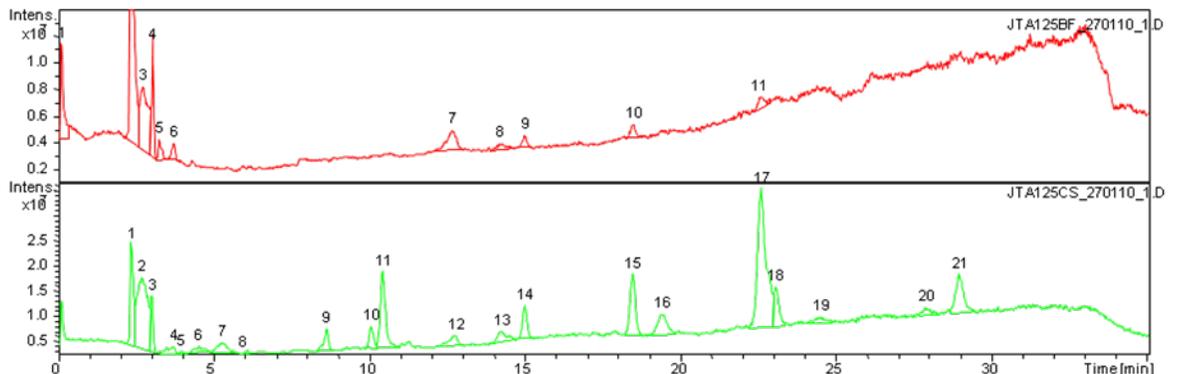


Figura 26: Cromatograma LC-MS de maca fresca liofilizada (recuadro superior) y maca seca molida (recuadro inferior).

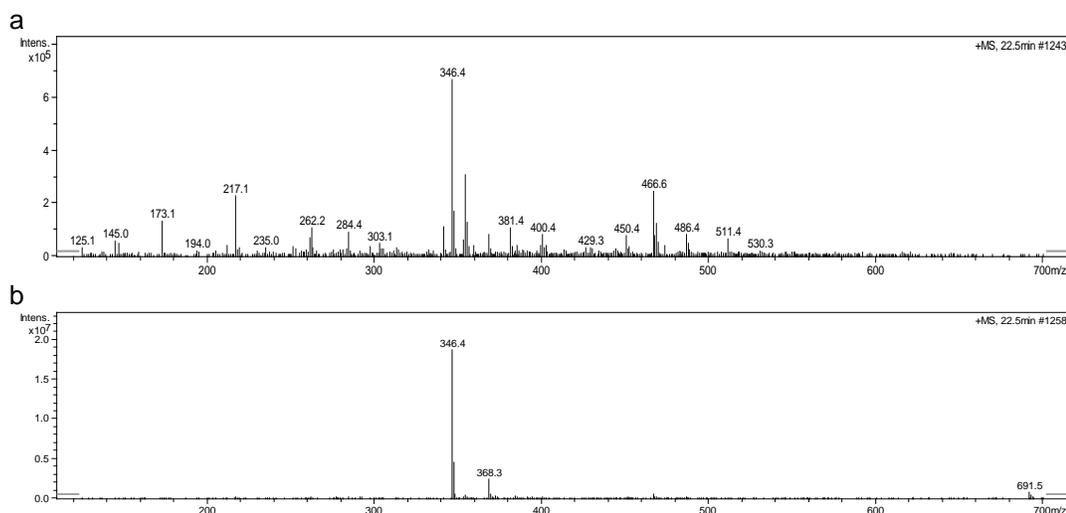


Figura 27: Comparación de los espectros de masas (ESI-MS) del pico 22.5 min que corresponde a MAC 16, en maca fresca liofilizada (a) y maca seca tradicional (b). Se inyectó a 4µl de maca fresca y 2 µl de maca seca.

De la misma manera se observó un incremento en el contenido de ácidos grasos insaturados libres y una disminución de BITC, de acuerdo a lo esperado. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Contenido de metabolitos analizados en maca seca molida y maca fresca liofilizada obtenida de diferentes mercados

Compuesto	Maca Fresca Liofilizada	Maca seca Molida
MACAMIDAS TOTALES	12.21 ± 0.63 µg/g	880.0 ± 28.9 µg/g
MAC 16	No detectable	463.6 ± 6.2 µg/g
AG insaturados	40.48 ± 0.77 µg/g	519.31 ± 17.04 µg/g
BITC	48.36 ± 0.29 µg/g	5.28 ± 1.33 µg/g
Bencilglucosinolato	24.32 ± 0.13 mg/g	2.83 ± 0.03 mg/g
Bencilamina	0.11 ± 0.004 mg/g	1.03 ± 0.01 mg/g

7.4.2. Entradas de germoplasma del CIP

Al igual que las muestras anteriores, diferentes entradas de germoplasma de maca provistas por el CIP fueron analizadas según el esquema 6.12.3, tanto frescas liofilizadas como secas según el método tradicional. Los resultados se muestran en las figuras 28 y 29. En estas muestras el proceso de secado ha sido controlado y las muestras frescas y secas son de la misma entrada y del mismo lote. Todas han seguido el mismo proceso.

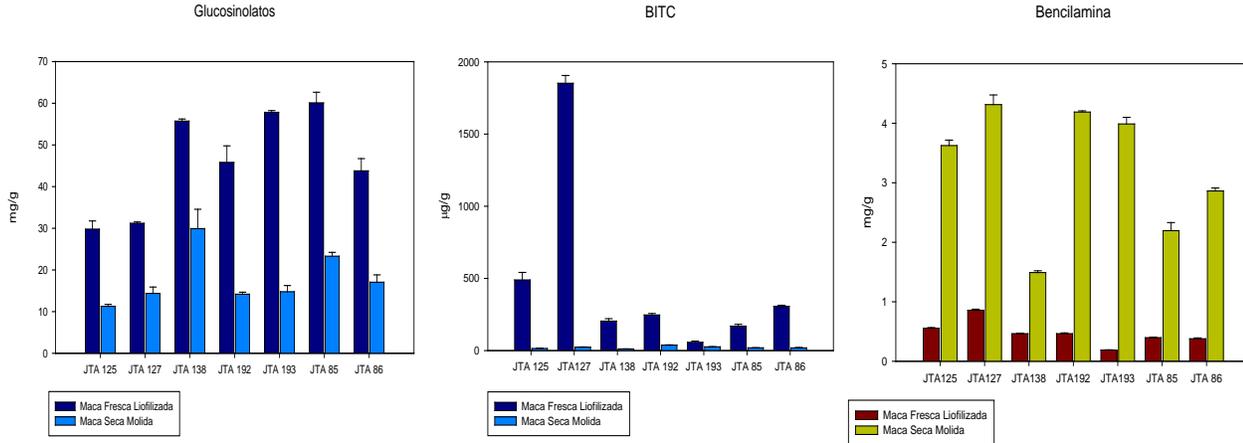


Figura 28: Gráficas del contenido de BGluc, BITC y BNH2 en muestras seca molida y fresca liofilizada de 7 entradas de germoplasma proporcionadas por el CIP

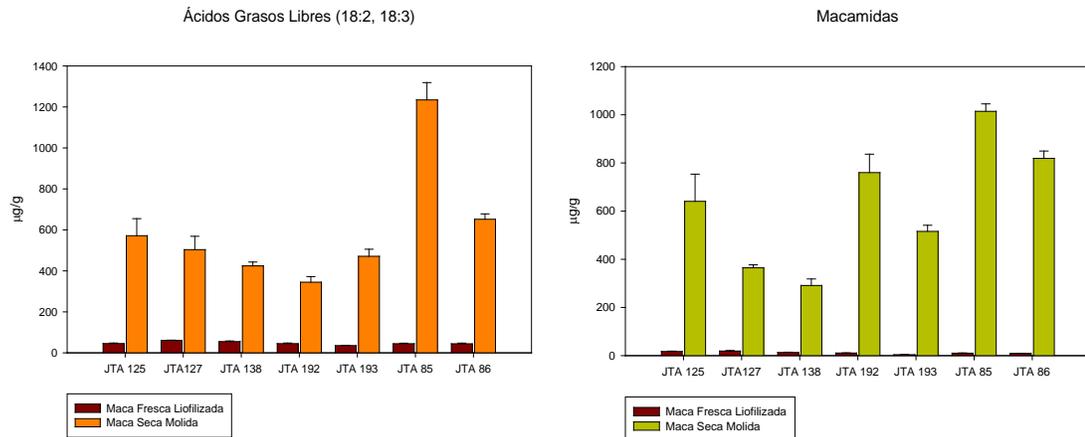


Figura 29: Contenido de ácidos grasos insaturados libres y macamidas en 7 entradas de germoplasma proporcionadas por el CIP

7.5. Análisis de compuestos bencil-derivados por cromatografía de gases

Se desarrollo un método que separó benzaldehido (BCHO), bencilalcohol (BOH), bencilnitrilo (BCN), bencilamina (BNH2), 4-metoxibencilamina (4m-BNH2), bencilisotiocianato (BITC) y 4-metoxi-bencilisotiocianato (4m-BITC) por cromatografía de gases. Se utilizó una columna DB-225, 30m x 0.32mm, 0.25µm que había mostrado buena resolución para compuestos bencilados en anteriores oportunidades.

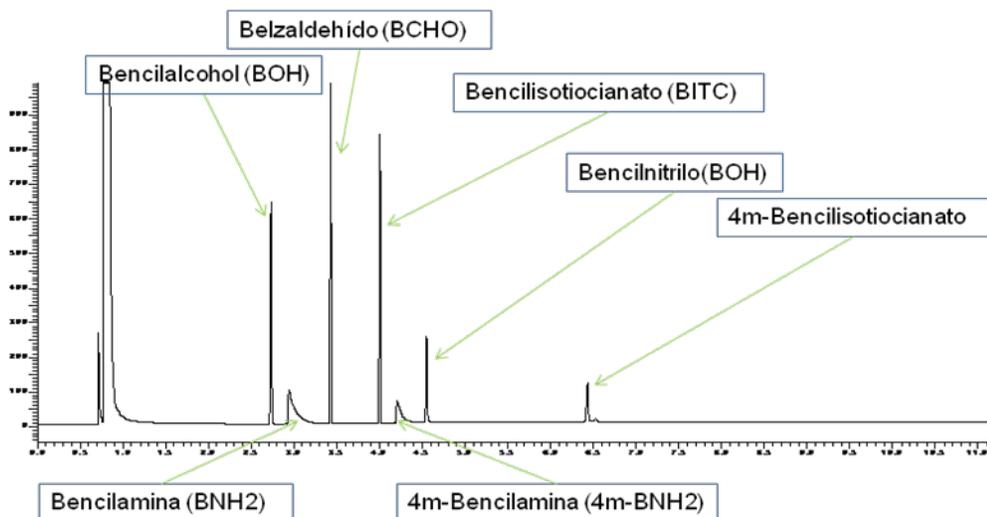


Figura 30: Cromatograma de gases (FID) de estándares bencilados. t BCHO= 2.74min, t BNH2= 3.11min, t BOH= 3.44min, t BCN= 4.01min, t 4m-BNH2= 4.30min, t BITC = 4.55 min, 4m-BITC= 6.42 min.

Se desarrolló un sistema similar en GC-MS usando muestreo con SPME (sección 6.10.1), básicamente cualitativo para comparar los perfiles (Figura 31).

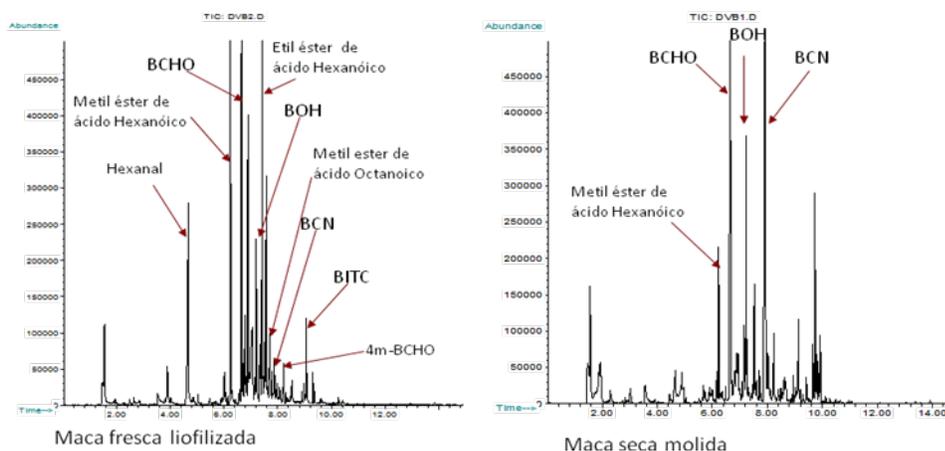


Figura 31: Perfil de volátiles en maca seca molida y maca fresca liofilizada por SPME-GC-MS.

Se observa en maca seca molida que los principales picos pertenecen a BCHO, estere etílicos y metílicos de ácidos grasos saturados, también en menor escala BOH y BCN, no se observa BITC. En maca fresca liofilizada, más bien, los principales picos pertenecen a BCHO, BOH y BCN, y en menor grado a ésteres metílicos, se observa un pequeño pico de BITC. Se corrió confines comparativos una muestra de maca fresca recién cortada para observar los primeros compuestos volátiles formados como producto de la ruptura celular.

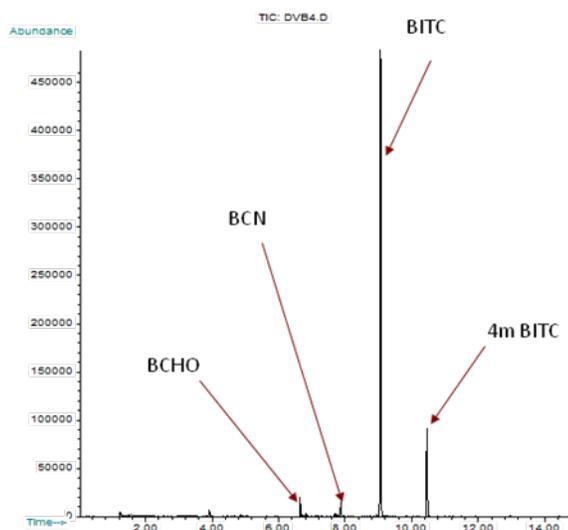


Figura 32: Productos de respuesta al corte de maca fresca

De acuerdo a lo esperado, el principal volátil producido es el BITC, seguido de BCN y 4m-BITC, todos ellos productos de la actividad de mirosinasa. Sin embargo se observa también una cantidad notable de BCHO.

7.6. Bioensayos con Ratones

7.6.1. Efecto sobre los pesos corporales y órganos reproductivos

El tratamiento con maca negra y los diferentes metabolitos administrados por tres días no afectaron el peso corporal ni el peso de órganos reproductivos ($P > 0.05$), como se muestran en las Figuras 33-35 y Tablas A6 y A7.

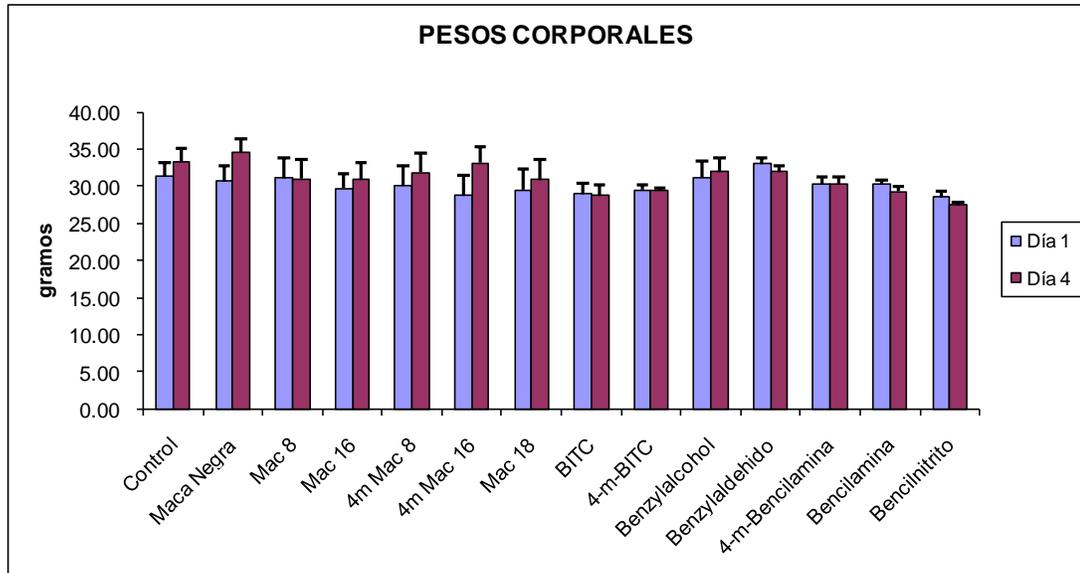


Figura 33. Pesos corporales luego de 3 días de tratamiento: $P > 0.05$ entre grupos

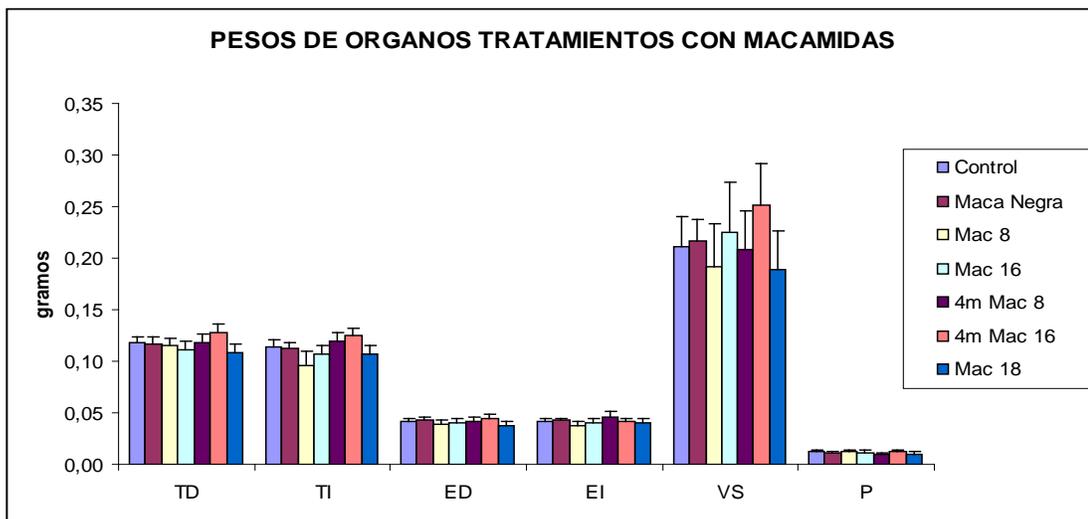


Figura 34. Pesos de órganos reproductivos luego de 3 días de tratamiento con Macamidas ($P > 0.05$ entre grupos).

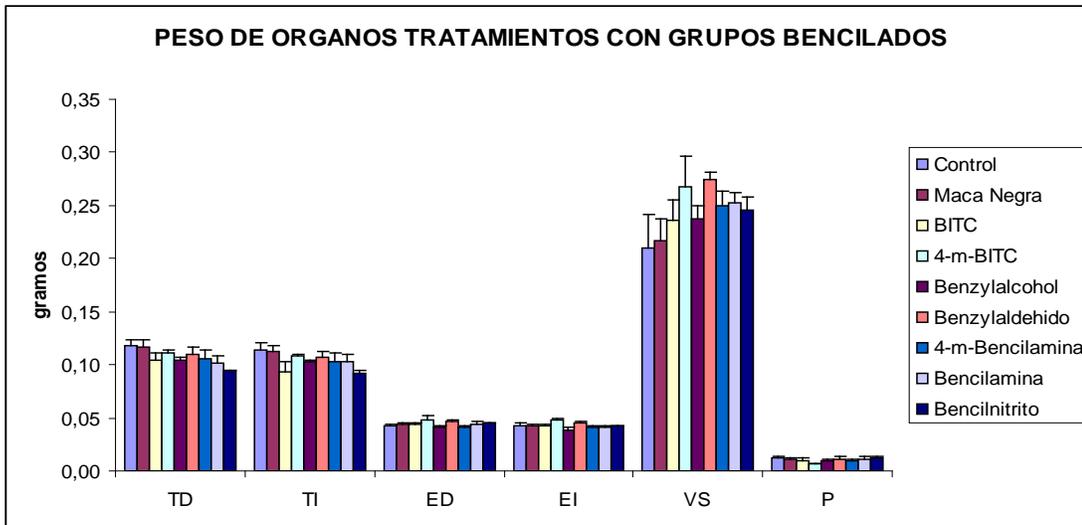


Figura 35. Pesos de órganos reproductivos luego de 3 días de tratamiento con grupos bencilados. $P > 0.05$ entre grupos

7.6.2. Efecto sobre el conteo de espermátides y espermatozoides

El extracto atomizado de maca negra que se utilizó como control positivo produjo un incremento en la producción diaria de espermatozoides (PDE), conteo de espermatozoides en epidídimo y en conducto deferente cuando se le compara con el grupo control ($P < 0.05$ en cada caso).

Ninguno de los compuestos estudiados incrementó los conteos de espermatozoides en los 3 parámetros estudiados. 4m-MAC 8 y 4m-MAC 16 incrementaron los valores de PDE y conteo de espermatozoides en conducto deferente ($P < 0.05$)

Luego de 3 días de tratamiento, el BITC ($P < 0.01$) y el 4m-BITC ($P < 0.05$) disminuyeron la Producción Diaria de espermatozoides (PDE). En epidídimo, el bencilalcohol aumento el conteo de espermatozoides ($P < 0.05$), en el caso del benzaldehído se observa un valor promedio mayor que el control sin significancia estadística. En este caso se recomienda aumentar la concentración de benzaldehído administrado o aumentar el tamaño muestral.

En conducto deferente MAC 8, MAC 16, 4m-MAC 8, 4m-MAC 16 y MAC 18, fueron las macamidas que incrementaron el número de espermatozoides a este nivel, mientras que en los grupos bencilados solo BCHO y BNH2 incrementaron el número de espermatozoides en el conducto deferente (Tabla 7).

Tabla 7. Producción diaria de espermatozoides (PDE) (millones/día), conteo de espermatozoides en epidídimo (millones/epidídimo) y conteo de espermatozoides en conducto deferente (millones/deferente) en ratones adultos tratados con extracto hidroalcohólico de maca negra o con productos sintéticos. Los datos son medias±error standard. ^aP<0.001; ^bP<0.05 respecto al grupo control.

Tratamiento	PDE (x 10 ⁶ /día)	Espermatozoides en epidídimo (x 10 ⁶)	Espermatozoides en conducto deferente (x 10 ⁶)
Control	2,45±0,14	17,78±1,08	3,33±0,30
Maca Negra	2,96±0,23 ^b	25,32±3,76 ^a	4,08±0,19 ^b
Mac 8	2,63±0,35	17,99±2,21	4,32±0,21 ^b
Mac 16	2,55±0,26	19,15±2,21	4,12±0,19 ^b
4m- Mac 8	3,12±0,26 ^b	16,08±2,35	4,52±0,20 ^b
4m- Mac 16	3,26±0,26 ^b	19,91±1,74	4,28±0,46 ^b
Mac 18	2,76±0,28	19,45±2,22	4,44±0,41 ^b
BITC	1,61±0,28 ^a	19,93±2,17	3,28±0,76
4m-BITC	1,87±0,24 ^b	15,23±1,56	3,38±0,47
BOH	2,37±0,05	21,37±0,75 ^b	2,91±0,24
BCHO	2,07±0,10	20,41±1,35	4,52±0,28 ^b
4m-BNH2	2,31±0,11	17,74±0,19	3,41±0,07
BNH2	2,06±0,11	15,45±0,50	4,39±0,26 ^b
BCN	2,10±0,06	14,63±0,91	2,72±0,01

7.6.3. Efecto sobre el tránsito epididimal

El tratamiento con BITC fue el único que modificó el tránsito de los espermatozoides hacia los dos segmentos evaluados del epidídimo (P<0.05), tanto la cabeza-cuerpo como la cola (Figura 36) (Tabla A7).

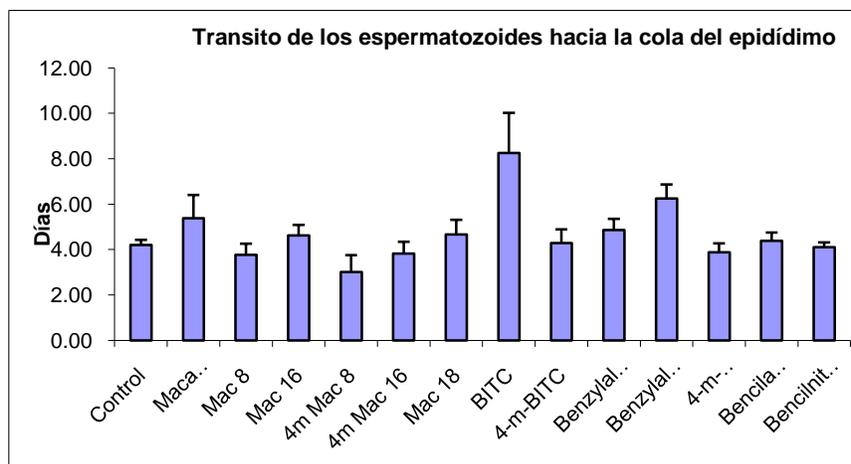


Figura 36. Transito de los espermatozoides hacia la cola del epidídimo. *P<0.05 respecto al grupo control

8. Discusión

La maca ha sido cultivada desde tiempos prehispánicos y aprovechada no solo por su alto valor nutricional y energético sino también por el hecho de favorecer la fertilidad tanto masculina como femenina. El gran número de propiedades medicinales que se le atribuyen son solo el reflejo del complejo metabolismo adaptativo que le sirve a la maca para sobrevivir y adaptarse en un ambiente hostil, como la puna, pero que también han sido favorecidos por el proceso de domesticación de esta especie. A esto se debe agregar que la maca se consume no solo fresca, sino también seca, para lo cual el hombre andino ha desarrollado durante siglos un método tradicional que cumple con sus expectativas nutricionales: la hace más dulce y mejora sus propiedades. (Canales y colaboradores, 2000).

Es necesario conocer los compuestos que le confieren sus propiedades medicinales pero también es necesario conocer cómo cambia o se altera la composición de la maca de acuerdo a si es silvestre o cultivada, roja, negra o amarilla, de Junín o de Pasco y las formas en que es procesada previo a su consumo. Cada paso agrega mayor variación en la composición.

Para llevar a cabo esta comparación se planteó una metodología que permitió analizar los compuestos marcadores básicos de actividad y calidad. Se eligieron los compuestos más representativos o aquellos de los que se había especulado en anteriores estudios. Desde su publicación, las macamidas han sido las principales sindicadas como responsables del aumento en la fertilidad reportada como aumento en el nivel espermático y mejora de la función eréctil (Zheng y colaboradores, 2001). Sin embargo estos estudios al igual que los posteriores trabajos de Gonzales y colaboradores (2001 a, 2001b, 2005) solo utilizan extractos completos o enriquecidos de maca, no usan compuestos puros.

En base a esto, lo primero que se pensó fue en sintetizar macamidas que funcionaran como estándares para un método analítico pero que, además, sirvieran para realizar los ensayos biológicos con compuestos puros y poder observar la relación entre estructura y actividad. Se escogieron los compuestos reportados en la literatura o los que podían estar presentes basándonos en los ácidos grasos más comunes en maca. Se decidió sintetizar macamidas de ácido palmítico (MAC 16), reportada como la más abundante (Mc. Collom y colaboradores, 2005, Muhammad y colaboradores, 2002), de ácido caprílico (MAC 8) (Zheng y colaboradores, 2000-2001) y de los ácidos esteárico, oleico, linoléico y linolénico (MAC 18, MAC 18:1, MAC 18:2, MAC 18:3), de este modo teníamos macamidas saturadas de distinta longitud de cadena (8, 16, 18 carbonos) y macamidas de la misma longitud pero con distintos grados de insaturación (18 carbonos con 0,1,2,3 dobles enlaces). Además de macamidas

(bencilcamidas) se sintetizaron sus respectivos 4-metoxi-bencil derivados. De esta forma podríamos observar la influencia del grupo metoxi sobre el anillo. Todas estas fueron sintetizadas, purificadas y caracterizadas según los métodos descritos (secciones 6.1-6.3) y con los resultados reportados en la sección anterior (secciones 7.1, 7.2).

Por otro lado, los glucosinolatos son compuestos presentes en las brassicáceas y sus productos metabólicos incluyen isotiocianatos y nitrilos. El glucosinolato mas importante en maca es el bencilglucosinolato (Li y colaboradores, 2001). Se ha reportado también la presencia de 4-metoxi y 4-hidroxi bencilglucosinolato (Li y colaboradores 2001) y de 3-metoxi bencilglucosinolato junto con la de sus respectivos isotiocianatos (Piacente y colaboradores, 2002). Los isotiocianatos son compuestos inestables frente a la oxidación o hidrólisis y se ha reportado la presencia de productos de descomposición como el bencilalcohol y el benzaldehído en la composición del aceite esencial (Tellez y colaboradores, 2002) así como la presencia de bencilnitrilo. En trabajos previos de nuestro laboratorio se observado la presencia de bencilamina en extratos protéico, tanto en proteína de membrana como en proteína libre (Coello, 2005). La presencia de todos estos compuestos nos sugiere un complejo metabolismo derivado de fenilalanina para producir compuestos que le sirven a la maca como defensa frente a factores externos como herbívoros, hongos y bacterias (Fahey y colaboradores, 2001). Por esta razón se decidió utilizar estos metabolitos como sujetos de análisis y en ensayos de actividad biológica.

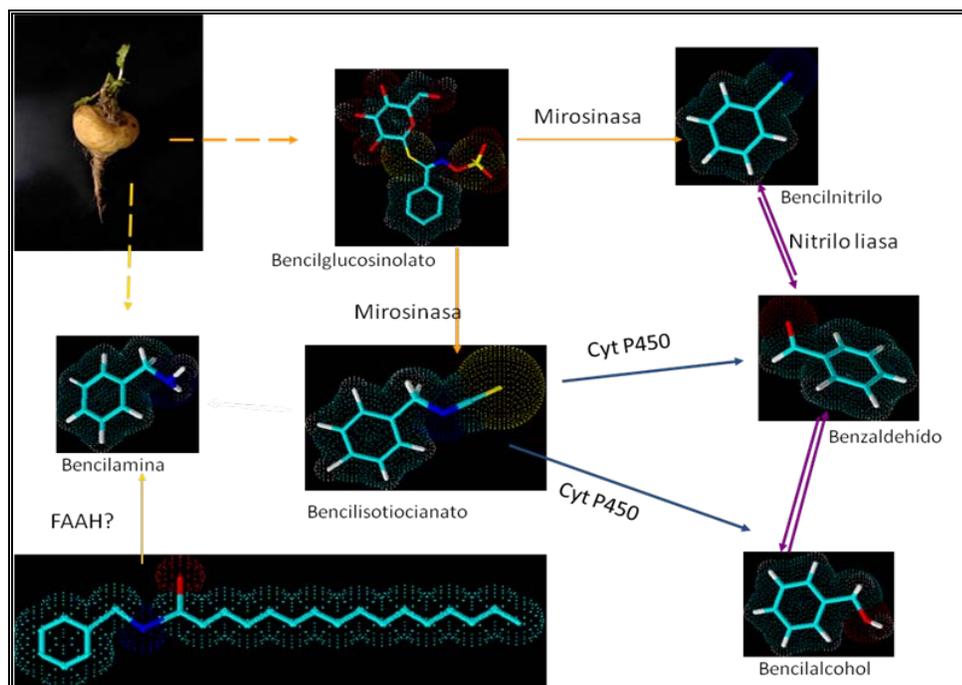


Figura 37: Esquema de la relación metabólica propuesta para los distintos metabolitos de maca.

8.1. Sobre la metodología

Se desarrolló una marcha analítica basada en métodos cuantitativos de análisis químico por cromatografía líquida para bencilglucosinolato, bencilisotiocianato y bencilamina además de macamidias y ácidos grasos insaturados, que permita comparar distintas muestras de maca.

Se realizó la extracción del material con 70% MeOH a 70°C durante una hora, con el fin de evitar cualquier actividad enzimática que pudiera producir artefactos durante la extracción. Este es el método que comúnmente se utiliza para extraer glucosinolatos y probó ser conveniente también para bencilamina, macamidias e isotiocianatos pues no arrastra gran cantidad de material hidrofóbico como en el caso de extracciones con 100%MeOH y es suficientemente hidrofílica para extraer con buena recuperación glucosinolatos y aminas.

Después de un proceso de optimización para el método de análisis de macamidias, que fue discutido con más detalle en el primer informe de este proyecto, en el que se probaron distintos gradientes y fases móviles, se optó por utilizar el método que se describe en la sección de métodos en el punto 6.6

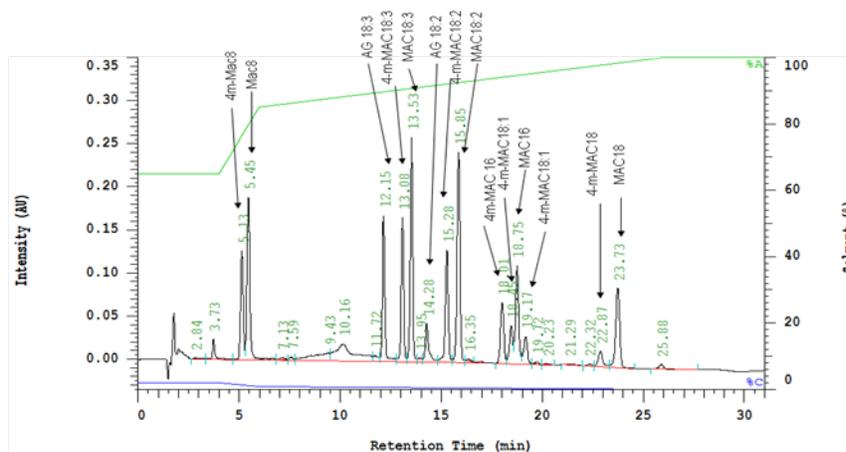


Figura 38: Cromatograma de la mezcla de estándares de 12 macamidias, ácido linoléico y linolénico con el método final (sección 6.6)

El método utilizado para la determinación de glucosinolatos (sección 6.8) es rutinario y se ha adaptado para este efecto en el laboratorio de bioanalítica (Geu, 2004), solo se ha variado la cantidad de mirosinasa para evitar problemas de desactivación de la enzima debidos a la producción de isotiocianato. Los resultados se muestran en la sección 7.4.

Los glucosinolatos son un indicador del procesamiento del material vegetal. Esto se debe a que la ruptura celular, producida por cualquier daño a la planta, permite activación de la enzima mirosinasa y su unión

con el glucosinolato para producir isotiocianatos y bajo condiciones especiales de pH y contenido de hierro, nitrilos. Por lo tanto se trató de procesar el material lo antes posible, con todos los cuidados posibles para evitar daño celular, sin embargo siempre existe la posibilidad de que el material haya estado expuesto a factores dañinos en campo y contenga BITC endógeno. El material fresco liofilizado fue cortado directamente sobre nitrógeno líquido inmediatamente liofilizado. Se pulverizó inmediatamente antes de la extracción, y durante la extracción se utilizó solvente caliente (70°C) para desactivar la enzima.

Con el fin de analizar bencilamina, que es uno de los productos del metabolismo del bencilglucosinolato que más nos interesa por ser base para la formación de las macamidas, se montó un método por HPLC que permitiera su identificación y cuantificación rápida. Se utilizó la derivatización pre-columna con *o*-ftaldialdehído (OPA), método bastante común para el análisis de aminoácidos y aminas biogénicas. (Blau y Halket, 1993)

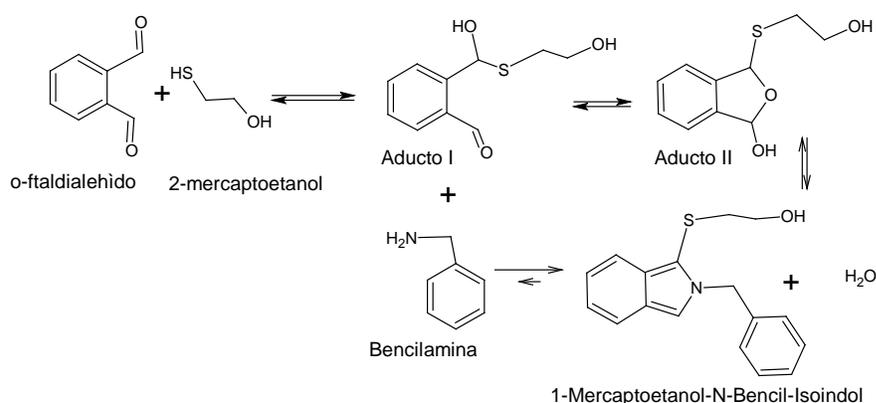


Figura 39: Mecanismo de formación de los derivados isoindólicos de bencilamina con OPA-2-mercaptoetanol (Simmons y Johnson, 1978)

La reacción se lleva a cabo durante 3 minutos exactamente, para completar la reacción. A tiempos mayores ocurre un descenso en la linealidad del método debido a que los isoindoles formados son inestables y descomponen vía un rearrreglo intramolecular que da un compuesto no fluorescente 2,3-dihidro-1H-isoindol-1-ona. El grado de inestabilidad depende del tiol y de la amina componentes, por lo tanto el control del tiempo debe ser bastante preciso. (Simmons y Johnson, 1978)

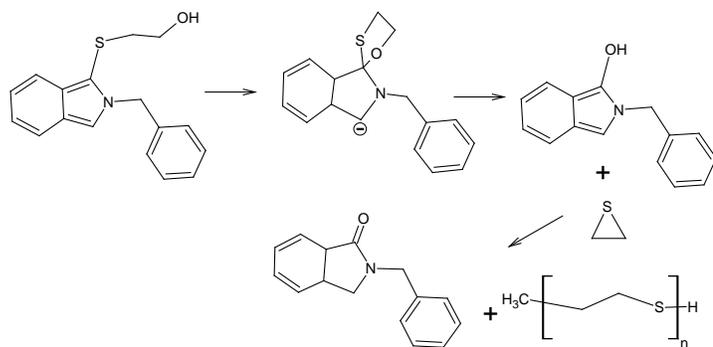


Figura 40: Reacción de descomposición del derivado fluorescente isoindólico de bencilamina al reaccionar con OPA-2-mercaptoetanol

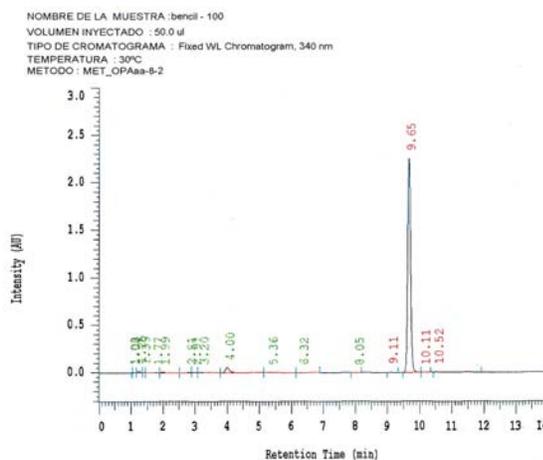


Figura 41: Cromatograma de bencilamina derivatizada con o-ftaldialdehido (OPA) ($t_r = 9.65$)

El sistema de HPLC para macamidas se mejoró durante la primera etapa del proyecto (y fue discutido en profundidad durante el primer informe) hasta obtener el sistema que se utiliza (método 6.6) para obtener la mejor resolución de picos, lo que se logró aumentando solo 5% de MeOH a la fase acuosa y manteniendo la misma concentración de ácido (TFA) tanto en la fase acuosa como en el ACN. Los resultados de se muestran en el punto 7.4.

Para la preparación de la muestra se planteó una pre-purificación mediante extracción en fase sólida (SPE) usando columnas de fase reversa (RP-18) acondicionadas en 50% MeOH. Antes de cargar la muestra se diluye hasta 50% MeOH y se carga, el material hidrofílico se elimina con un lavado de 50% MeOH. No se usa 70% porque elimina el BITC y las macamidas más ligeras (MAC8 y 4m-MAC8). Las macamidas se recuperan completamente en 100% MeOH.

En resumen, se eligió el esquema de extracción en fase sólida en paralelo (método 6.13.3) por varias razones: en primer lugar, la extracción en fase sólida es adecuada para ensayos cuantitativos pues los volúmenes que se

manejan son menores y no existe el problema de formación de emulsiones o pérdidas de volumen durante la extracción. Por otro lado se trabaja con solventes compatibles con los métodos cromatográficos utilizados para la cuantificación (HPLC). En segundo lugar un esquema paralelo permite realizar ensayos simultáneos de SPE, con lo cual se optimiza el tiempo total de análisis y evita que los metabolitos puedan estar quedando retenidos en un paso previo de SPE. Sin embargo, la extracción en fase sólida de aminas por intercambio catiónico no producía mejoras en la pre-purificación, sino que por el contrario, introducía picos al sistema de HPLC después de la derivatización, por lo cual se prefirió derivatizar las aminas directamente de la solución stock inicial.

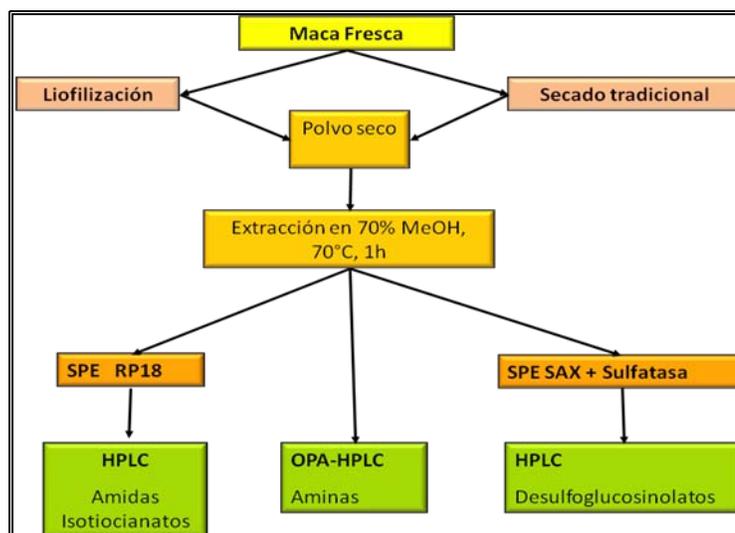


Figura 42: Esquema final de análisis de muestras de maca

El esquema completo es lo bastante robusto y sencillo como para ser aplicado de manera rutinaria en cualquier laboratorio de control de calidad.

8.2. Sobre los resultados obtenidos:

Los métodos desarrollados nos han permitido la comparación cuantitativa de metabolitos de maca previamente reportados en la literatura. Uno de los objetivos era precisamente comparar distintas entradas de germoplasma de maca para determinar cualquier diferencia que favorezca el cultivo de una entrada sobre otras por su mayor contenido de metabolitos secundario. En un primer momento y con el fin de validar los métodos se utilizó maca obtenida comercialmente y se analizó muestras de maca fresca liofilizada y maca seca molida obtenida en un mercado de la ciudad de Huancayo. Curiosamente los resultados de esta primera etapa fueron los más interesantes.

Se observó una pérdida mayor al 80% del contenido de glucosinolatos. Al ser muestras comerciales y no relacionadas no puede asegurarse que el

total de esta diferencia se deba solo al proceso de secado. El contenido de glucosinolatos es dependiente del tratamiento que haya tenido la muestra pues cualquier proceso degradativo que produzca ruptura celular favorece su degradación enzimática por acción de la enzima mirosinasa. Sin embargo los resultados concuerdan con los valores encontrados por Li y colaboradores (2001) quienes encuentran una notable diferencia en los valores de glucosinolatos para maca seca y maca fresca. Los valores encontrados en la sección 7.4.1 son similares a los reportados por Piacente (2002).

Mediante LC-MS se identificó los glucosinolatos presentes en forma de sus correspondientes desulfoglucosinolatos, tanto en maca seca como en maca fresca liofilizada. Conforme a lo esperado, el pico mayoritario es el de bencilglucosinato que corresponde a un 71% del área total integrada de glucosinolatos en maca fresca liofilizada y que corresponde a 24.3 ± 0.13 mg/g de maca. Los compuestos que le siguen en importancia son los pertenecientes al 4-metoxi-bencilglucosinato ($t=19.05$ min, 12%), 3-hidróxi-bencilglucosinato ($t=13.28$ min, 7.3%). En menor cantidad se encuentra el 4-hidroxibencilglucosinato ($t=11.07$ min, 1%). Esto es acorde a lo reportado por Piacente (2002), sin embargo Li y colaboradores (2001) observan mayor cantidad de 4-hidroxibencilglucosinato y reconoce tentativamente el 3-hidroxibencilglucosinato. Para confirmar nuestras observaciones se corrió un estándar de 4-hidroxibencilglucosinato que apareció a 11 minutos y coincidió con el M+Na observado.

Se observó, también, la presencia de dos glucosinolatos indólicos identificados en la sección de resultados 7.4. Estos no se observan en maca seca posiblemente porque están por debajo del límite de detección del método, dado en maca fresca se encuentran en cantidades relativamente pequeñas.

Al analizar la diferencia existente entre los valores de glucosinolatos hallados para las muestras del CIP, con las que se ha tenido un proceso de secado controlado se observa que los valores varían entre 33.95 ± 9.07 mg/g para maca fresca liofilizada y 14.73 ± 5.61 mg/g para maca seca con una desaparición de glucosinato del orden del 56% en promedio. La entrada JTA193 es la que presenta una mayor pérdida de glucosinolatos (74%). Nuevamente es importante considerar que el tratamiento de la muestra es fundamental para evitar pérdida de glucosinolatos previos al análisis (Figura 28).

También es lógico encontrar valores mayores de isotiocianato en maca fresca que en maca seca pues los isotiocianatos son químicamente inestables y se producen inmediatamente después del corte o daño celular. La maca seca está expuesta a condiciones climáticas extremas que dañan el tejido de manera constante, los isotiocianatos estarían presentes en mayor cantidad durante la primera etapa del proceso, sin

embargo conforme el tiempo avance estos se irían degradando por procesos de hidrólisis o de oxidación química espontánea. Durante el proceso de secado hemos observado una desaparición del 87% del contenido de BITC. Los valores observados de BITC en maca fresca en las distintas entradas de germoplasma del CIP varían bastante en el caso de maca fresca, donde tenemos que JTA193 tiene 57ug/g mientras JTA127 tiene 1851ug/g teniendo un promedio general de 475u/g. Es importante notar que la variación existente entre entradas de germoplasma distintas no es mayor que la variación existente entre la versión seca y fresca de cada entrada (Figura 28).

Por otro lado el análisis de bencilamina muestra que el proceso de secado intensifica la cantidad de bencilamina presente en maca, producto de procesos hidrolíticos durante el procesamiento en campo. Se observa una aparición del 850-900%. Para las distintas entradas de germoplasma del CIP se encuentra un promedio de bencilamina 0.41 ± 0.19 mg/g en maca fresca y 3.61 ± 1.09 mg/g en maca seca, lo que corresponde a un aumento promedio de 900%. En el caso de JTA193 la aparición de bencilamina llega a representar el 2000%, mientras en JTA138 es sólo el 200%, Si embargo la cantidad de bencilamina endógena en maca fresca para JTA138 es 4 veces mayor que en JTA193. No hay reportes en la literatura de la presencia de bencilamina en maca. Esta es la primera vez que se cuantifica bencilamina libre en maca tanto fresca como seca.

Durante el proceso de secado es también lógico esperar un mayor contenido de ácidos grasos libres generados por la ruptura de membranas y procesos hidrolípidicos. Consecuente con esta sospecha, se observa un aumento de ácidos grasos libres (linoléico y linolénico) en maca seca (519.3 ± 17.0 ug/g) en relación a maca fresca liofilizada (40.5 ± 0.8 ug/g) lo que corresponde a un aumento de 1200% en el contenido de ácidos grasos libres. El análisis de muestras del CIP es consecuente con esta observación (Figura 29). Se puede observar que el contenido de ácidos grasos en maca fresca es relativamente parejo (17% de desviación estandar). Sin embargo en maca seca se observa una mayor desviación (aproximadamente 50% de desviación entre muestras). En especial es de notar el caso de JTA85 que contiene más del doble de ácidos graso que las demás entradas. Esto se puede deber a que el proceso de secado induciría, en algunos casos, una mayor actividad hidrolítica que en otros, dependiendo del contenido de inhibidores enzimáticos o antioxidantes.

Hasta este punto se sigue con la lógica de que el deterioro celular provoca la liberación o degradación de compuestos por mecanismos hidrolíticos enzimáticos. Sin embargo, al analizar en contenido de macamidas nos encontramos con que, contrario a los que hubiese esperado el contenido de amidas en maca seca molida (880 μ g/g) es aproximadamente 7000% en contenido de macamidas en maca fresca (12.2 μ g/g), observación que

concuenda con lo observado en las distintas entradas de germoplasma del CIP, en las que el proceso de secado ha sido controlado.

También es interesante notar que la formación de ácidos grasos insaturados libres está bastante relacionada con la formación de macamidas, pues coincide que a mayor formación de AGi, mayor contenido de macamida formada, lo que no ocurre necesariamente con la formación de bencilamina. Esto sugeriría que el contenido de ácidos grasos libres es fundamental para la formación de amidas, y sería el paso limitante.

Este es el primer trabajo que reporta la diferencia existente en el contenido de macamidas debida al proceso de secado tradicional. En la bibliografía revisada rara vez se especifica el procedimiento usado para secar la maca y se confunde maca seca con maca tostada o liofilizada tratándolas como iguales (es decir, maca seca). Es notable la influencia del procesamiento en la producción de macamidas.

Si bien el contenido de macamidas en maca fresca es muy bajo en relación a maca fresca, si existe presencia de estas pero en cantidades por debajo del límite de detección de nuestra metodología. Fue necesario hacer LC-MS (sección 7.4.1) de maca fresca para confirmar la presencia de macamidas, sin embargo, como se dijo anteriormente, estas se encuentran en concentraciones muy bajas y en algunos casos por debajo del límite de cuantificación. Estas pequeñas cantidades pueden también ser un producto del proceso de corte y liofilizado, y no ser productos de acumulación natural en el hipocotilo.

Las amidas existen en todos los seres vivos. En animales, etanolamidias a nivel de sistema nervioso tienen funciones vitales controlando el llamado "reloj biológico" y determinan estados de apetito, sueño, atención entre otros (Bisoño y colaboradores, 2002; Cravatt y colaboradores, 1996; Nielsen y colaboradores, 2004). En plantas las etanolamidias han sido relacionadas a procesos de crecimiento de raíz y germinación (Chapman y colaboradores, 1999). Sin embargo existen amidas en el género *Piper* que están relacionadas a sistemas de defensa y controlan relaciones cooperativas con hormigas (Dyer y colaboradores, 2004). En *Capsicum sp.*, la capsaicina es la más conocida de las amidas reportadas y es la responsable del sabor picante del ají y los pimientos chile. La capsaicina es una amida formada por la reacción de vainillina con un acil-CoA.

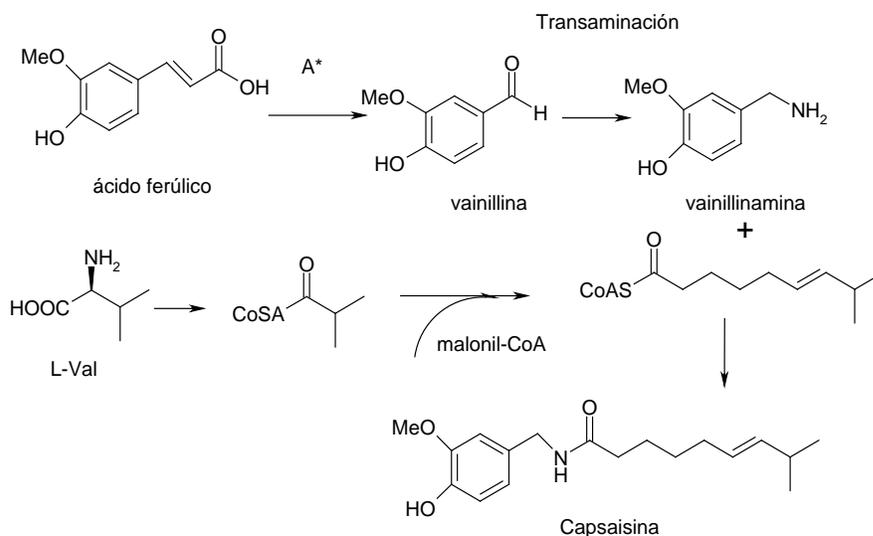


Figura 43: Formación de capsaisina a partir de vainillinamina (Dewick, 1997)

La capsaisina (y posiblemente, las macamidas), es producida por transaminación del aldehído vainillina (benzaldehído para el caso de las macamidas) formado por la pérdida del grupo amino y la posterior oxidación, partiendo de tirosina (o fenilalanina en el caso de macamidas), para finalmente, obtener la amina por transaminación, la cual reacciona con acil-CoA para producir la amida. Este mecanismo podría o no ser enzimático. Se sabe que amidasas de ácido graso (FAAH) microsomales pueden sintetizar amidas mediante dos mecanismos distintos: el primero involucra un intermedio de acil-coenzima A, el segundo se basa en una amidasa reversible (Bachur y Udenfriend, 1966). Para ello es necesario un estudio más profundo de la cinética de secado. Es necesario conocer la influencia de los factores ambientales en el proceso de secado, sobretodo la exposición a luz solar, y a cambios bruscos de temperatura y saber hasta qué punto influyen en la formación de amidas.

9. Conclusiones

- 9.1. Existe una diferencia notable entre maca seca y maca fresca en cuanto al contenido de los compuestos indicadores.
- 9.2. Se observa una disminución en el contenido de glucosinolatos e isotiocianatos y un aumento de bencilamina, ácidos grasos y macamidas durante el proceso de secado.
- 9.3. Las macamidas parecen ser un producto del proceso de secado.
- 9.4. Se ha desarrollado métodos analíticos para la determinación de macamidas, glucosinolatos, bencilamina, y compuestos derivados de bencilaglucoisolato en una sola marcha. Además se ha obtenido compuestos para aplicación como estándares, sintetizados y caracterizados.

- 9.5. El extracto hidroalcohólico atomizado de maca negra aumenta el conteo de espermatozoides en testículo, epidídimo y conducto deferente.
- 9.6. Las macamidas: MAC 8, MAC 16, 4m MAC 8, 4m MAC 16 y MAC 18 tuvieron efecto positivo sobre el número de espermatozoides en el conducto deferente.
- 9.7. El grupo bencilado BITC disminuyó la PDE.
- 9.8. Los grupos bencilados BCHO y BNH2 incrementaron el conteo de espermatozoides en conducto deferente. Bencilalcohol aumentó el número de espermatozoides en epidídimo.
- 9.9. El BITC incrementó el tránsito de los espermatozoides hacia el epidídimo.
- 9.10. Se ha generado capacidades, gracias al programa de pasantías que tiene la PUCP, por el que se contó en el proyecto con la colaboración de la Sra. Yéssica Bendezú de la Universidad Nacional del Centro del Perú de Huancayo, quien se estuvo capacitando en nuestro laboratorio en el uso de equipos y rutinas de análisis químico bioanalíticas. Durante la segunda etapa se tuvo como practicante a Brenda D'Acunha, estudiante de tercer año de la especialidad de química.
- 9.11. Este trabajo forma parte de la tesis de licenciatura de Eliana Esparza.

10. Equipo Técnico

Eric G. Cosio Caravasi (Pontificia Universidad Católica del Perú)
Gustavo Gonzales Rengifo (Universidad Peruana Cayetano Heredia)
Eliana Esparza Ballón (Pontificia Universidad Católica del Perú)
Waltraud Kofer (Pontificia Universidad Católica del Perú)
Vanesa Vásquez (Universidad Peruana Cayetano Heredia)
Yéssica Bendezú (Universidad Nacional del Centro del Perú)
Brenda D´Acunha (Pontificia Universidad Católica del Perú)
Manuel Gasco Tantachuco (Universidad Peruana Cayetano Heredia)
Carlos Arbizu (Centro Internacional de la Papa)

10. Bibliografía

- ALIAGA R., ESPINOZA E., RODRIGUEZ, G., VILLAGOMEZ, V., JANAMPA, M., LLANOS, M., 2007; La cadena de valor de maca en la meseta del Bombón Junín, Documento de Trabajo. Peru Biodiverso, Lima.
- BACHUR N. R., UDENFRIEND S., 1966; Microsomal synthesis of fatty acid amides; *Journal of Biological Chemistry*, 241: 1308-1311.
- BISOGNO T., DE PETROCELLIS L., DI MARZO V., 2002; Fatty Acid Amide Hydrolase, an Enzyme with Many Bioactive Substrates. Possible Therapeutic Implications, *Current Pharmaceutical Design*, 8: 125-133.
- BLAU K., HALKET J. (editores), 1993; *Handbook of derivatives for chromatography*, 2da edición, Londres: John Wiley & Sons.
- BOGANI P., SIMONINI F., IRITI M., ROSSONI M., FAORO F., POLETTI A., VISIOLI F., 2006; *Lepidium meyenii* (Maca) does not exert direct androgenic activities; *Journal of Ethnopharmacology* 104: 415–417
- CANALES M., AGUILAR J., PRADA A., MARCELO A., HUAMÁN C., CARBAJAL L. 2000; Nutritional evaluation of *Lepidium meyenii* (MACA) in albino mice and their descendants; *Arch Latinoamerican Nutrition*, 50: 126-33.
- CHAPMAN K. D., VENABLES B., MARKOVIC R., BLAIR R. W., BETTINGER C., 1999; N-Acylethanolamines in seeds. Quantification of molecular species and their degradation upon imbibition; *Plant Physiology*, 120: 1157–1164.
- CICERO A.F.G., BANDIERI E., ARLETTI R., 2001; *Lepidium meyenii* Walp., improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity; *Journal of Ethnopharmacology*, 75: 225–229.
- COELLO Y., 2005; Evaluación del metabolismo hidrolítico de N-bencil alquilamidas en *Lepidium meyenii*, Walp.; Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Especialidad de Química, PUCP, Lima, Perú.
- CRAVATT, B.F., LERNER, R.A. AND BOGER, D.L., 1996; Structure determination of an endogenous sleep-inducing lipid, cis-9-octadecenamide (oleamide): a synthetic approach to the chemical analysis of trace quantities of a natural products, *Journal of American Chemical Society*, 118: 580-590.
- CUI B., ZHENG, B. L., HE K., ZHENG Q. Y., 2003; Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*; *Journal of Natural Products*, 66: 1101-1103.
- DINI, A., MIGLIUOLO, G., RASTRELLI, L., SATURNINO, P., SCHETTINO, O., 1994; Chemical Composition of *Lepidium meyenii*; *Food Chemistry*, 49: 347-349.
- DEWICK P.; 1997; *Medicinal Natural Products, A biosynthetic approach*; John Wiley and sons; New York.
- DYER L. A., RICHARDS J., DODSON C. D., 2004; Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides, en Dyer L. A., Palmer A.D.N. (editores); *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp., 117-139.
- FAHEY J.W., ZALCMANN A.T., TALALY P., 2001; The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants; *Phytochemistry*, 56: 5-51

GARRÓ V., 1996; Investigación Química y Biológica de *Lepidium meyenii*, Walp (maca); Revista Theorema, Año 4, Volumen 6, Lima, Perú.

GASCO M., AGUILAR J., GONZALES G.F., 2007; Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats; *Andrologia*, 39: 151-8.

GEU F., 2004; Purificación y caracterización de la enzima mirosinasa a partir de tubérculos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.), Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Especialidad de Química, PUCP, Lima, Perú.

GONZALES, G.F. , RUIZ, A., GONZALES, C., VILLEGAS, L., CORDOVA, A., 2001 (a); Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats; *Asian Journal of Andrology*, 3: 231-233.

GONZALES G. F.; CÓRDOVA A.; GONZALES C., 2001(b); *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men; *Asian Journal of Andrology*, 3: 301-303.

GONZALES, G.F., GASCO, M., CÓRDOVA, A., CHUNG, A., RUBIO, J., VILLEGAS, L., 2004; Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m); *Journal of Endocrinology*, 180: 87–95.

GONZALES, G.F., MIRANDA, S., NIETO, J., FERNANDEZ, G., YUCRA, S., RUBIO, J., YI, P., GASCO, M., 2005; Red maca (*Lepidium meyenii*) reduce prostate size in rats; *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 1-16.

GONZALES G.F., NIETO J., RUBIO J., GASCO M., 2006; Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats; *Andrologia.*, 38: 166-172.

HERRAIZ T., 2000; Tetrahydro- β -carboline, potential neuroactive alkaloids, in chocolate and cocoa; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4900-4904.

JERI CARDINAL, H., 1995; Estudio fitoquímico de *Lepidium meyenii*, Walp.; Tesis, Pasco, Perú.

JI W., ZHANG Y., MEI S. , XIONG Y. , YANG Q., YU L., 2007; Identification of *Lepidium meyenii*, (Walp.) based on spectra and chromatographic characteristics of its principal functional ingredients; *Journal of Science of Food and Agriculture*, 87: 2251-2258.

JONHS T., 1980; Ethnobotany and Phytochemistry of *Tropaelum tuberosum* and *Lepidium meyenii* from Andean of South America; Tesis doctoral, U. British Columbia, Canada.

JOHNS T., KITTS W.D., NEWSOME F., TOWERS N., 1982; Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaelum tuberosum*; *Journal of Ethnopharmacology*, 5: 149-161.

LI G., AMMERMAN U., QUIROZ C.F., 2001; Glucosinolate contents in Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived comercial products; *Economic Botany*, 55: 255-262.

LOBATÓN, M.:1998, Micronutrientes en *Lepidium meyenii* W. (maca-maca) y actividad en sujetos con anemia ferropénica e hiperlipidemia. Tesis de maestría, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, Lima-Perú.

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; *Phytochemical Analysis*, 16: 463-469.

MUHAMAMMAD I., ZHAO, J. DUNBAR, C., KHAN, I.A.; 2002; Constituents of *Lepidium meyenii* "Maca"; *Phytochemistry* 59: 105-110.

NIELSEN M. J., PETERSEN G., ASTRUP A., HANSEN H. S., 2004; Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide; *Journal of Lipid Research*, 45: 1027-1029.

PIACENTE, S., CARBONE, V., PLAZA, A., ZAMPELLI, A., PIZZA, C.; 2002; Investigation of tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.); *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5621-5625.

PROMPEX, 2008; Estadística de exportación de maca, comunicación personal y página web de Prompex:
http://www.prompex.gob.pe/stat/pr_modprot.asp

QUIROZ, C., ALIAGA, R., 1997; Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). En Hermann M. y Heller J. (editores); *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. Roma: Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, pp. 173-197.

RUBIO J., DANG H., GONG M., LIU X., CHEN S., GONZALES G.F., 2007; Aqueous and hydroalcoholic extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice; *Food and Chemical Toxicology* 45: 1882–1890.

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N.N., ANGELES, F.M., MELCHOR, V.V., CONDEZO, L.A., LAO, J., MILLER, M.J.S.; 2002; Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*); *Food Chemistry* 39: 207-213.

SIMONS S. S., Jr., y JOHNSON D. F., 1978; Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: Formation of 1-alkyl (and aryl)thio-2-alkylisoindoles; *Journal of Organic Chemistry*, 43: 2886-2891.

TELLEZ M., KHAN I., KOBALSY M., SHRADER K.K., DAYAN F.E., OSBRINK W., 2002; Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.); *Phytochemistry*, 61: 149-155.

TOLEDO J., QUIROZ C.F.; 1998; Genetic variability of *Lepidium meyenii* and other Andean *Lepidium* species (Brassicaceae) assessed by molecular markers; *Annals of Botany* 82: 523-530.

YLLESCAS, M, 1994; Estudio químico y fitoquímico comparativo de tres ecotipos de *Lepidium meyenii*, Walp. "maca" procedente de Carhuamayo (Junin). Tesis de licenciatura, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, Lima-Perú.

YUCRA S., GASCO M., RUBIO J., NIETO J., GONZALES G.F., 2008; Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats; *Fertility and Sterility*, 89: 1461-1467.

ZHAO, J., MUHAMMAD, I., DUNBAR, D. C., MUSTAFA, J., & KHAN, I. A., 2005; New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*); J. Agric. Food Chem. 53: 690-693.

ZHENG, B.L., HE, K., KIM, C.H., ROGERS, L., SHAO, Y., HUANG, Z.Y., LU, Y., YAN, S.J., QIEN, L.C., ZHENG, Q.Y., 2000; Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats; Urology, 55: 598-602

ZHENG, B.L., CALVIN W., KIM W., WOLTHOFF S., HE K., ROGERS L., SHAO Y., ZHENG Q.Y., 2001; Extract of *Lepidium meyenii* roots for pharmaceutical applications, US.Patent N° 6,267,995 B1; Julio. 31, 2001.

11. Anexo

Tabla A1: Contenido de macamidas en 7 entradas de germoplasma de maca, comparándolas frescas liofilizada y secadas al ambiente en el campo.

Mac. Totales	Seca (ug/g)	Fresca (ug/g)	% Incremento
JTA 125	640.69 ± 112.84	17.40 ± 1.43	3581.85
JTA127	364.55 ± 12.29	19.11 ± 2.12	1807.53
JTA 138	291.24 ± 27.21	13.24 ± 0.98	2098.98
JTA 192	759.96 ± 76.57	10.79 ± 0.70	6941.73
JTA 193	515.72 ± 25.55	3.79 ± 0.61	13501.51
JTA 85	1014.46 ± 30.78	10.09 ± 1.19	9956.89
JTA 86	819.03 ± 30.28	9.41 ± 0.39	8606.90
Promedio	629.38	11.98	6642.20
Des.Est.	257.82	5.17	4384.97

Tabla A2: Contenido de ácidos grasos insaturados de 7 entradas de germoplasma de maca tanto frescas liofilizadas como secadas de la manera tradicional.

AGi Totales	Seca (ug/g)	Fresca (ug/g)	% Incremento
JTA 125	571.37 ± 83.04	45.45 ± 2.45	1157.03
JTA127	503.37 ± 65.11	60.14 ± 1.86	737.04
JTA 138	424.04 ± 18.89	55.07 ± 2.72	669.99
JTA 192	344.64 ± 27.04	45.19 ± 2.51	662.65
JTA 193	470.88 ± 34.63	35.36 ± 1.39	1231.56
JTA 85	1234.03 ± 84.53	44.69 ± 2.26	2661.34
JTA 86	651.73 ± 25.97	44.35 ± 2.88	1369.61
Promedio	600.01	47.18	1212.75
Des.Est.	296.55	8.07	701.19

Tabla A3: Contenido de BITC de 7 entradas de germoplasma de maca tanto frescas liofilizadas como secadas de la manera tradicional.

BITC	Seca (ug/g)	Fresca (ug/g)	% Pérdida
JTA 125	14.36 ± 2.75	489.71 ± 51.49	97.07
JTA127	23.95 ± 1.69	1851.44 ± 54.23	98.71
JTA 138	11.07 ± 0.81	204.49 ± 16.62	94.58
JTA 192	37.64 ± 2.13	246.30 ± 10.76	84.72
JTA 193	26.26 ± 0.83	57.51 ± 8.19	54.34
JTA 85	18.90 ± 0.99	169.33 ± 12.77	88.84
JTA 86	18.50 ± 2.79	306.33 ± 7.51	93.96
Promedio	21.53	475.01	87.46
Des.Est.	8.80	621.35	15.37

Tabla A4: Contenido de bencilglucosinolato de 7 entradas de germoplasma de maca tanto frescas liofilizadas como secadas de la manera tradicional.

BGlu	Fresca (mg/g)	Seca (mg/g)	% Perdida
JTA 125	21.84 ± 1.44	8.26 ± 0.34	62.2
JTA 127	22.87 ± 0.23	10.54 ± 1.11	53.9
JAT 138	40.85 ± 0.36	21.94 ± 3.35	46.3
JTA 192	33.58 ± 2.90	10.40 ± 0.35	34.7
JTA 193	42.38 ± 0.32	10.83 ± 1.09	74.4
JTA 85	44.06 ± 1.86	17.08 ± 0.67	61.2
JTA 86	32.09 ± 2.15	12.51 ± 1.28	61.0
Promedio	33.95	14.73	56.2
Desv.Est.	9.07	5.61	12.8

Tabla A5: Cantidad de bencilamina en muestras de maca fresca liofilizada y maca seca molida de 7 entradas distintas de germoplasma.

BzNH2	Fresca (mg/g)	Seca (mg/g)	% Aparición
JTA125	0.56 ± 0.01	3.62 ± 0.09	552.62
JTA127	0.86 ± 0.02	4.31 ± 0.16	403.64
JTA138	0.46 ± 0.01	1.49 ± 0.03	221.86
JTA192	0.46 ± 0.01	4.19 ± 0.02	804.40
JTA193	0.19 ± 0.00	3.99 ± 0.11	2016.87
JTA85	0.40 ± 0.01	2.19 ± 0.14	453.41
JTA86	0.38 ± 0.01	2.86 ± 0.05	657.27
Promedio	0.41	3.61	934.30
DesvEst.	0.19	1.09	868.25

Tabla A6: Pesos corporales al inicio y final de los tratamientos. Los grupos fueron similares entre sí ($P > 0.05$) tanto al inicio como al final de los tratamientos, los datos muestran la media ± error estándar

Tratamiento	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)
Control	31,33±1,77	33,36±1,84
Maca Negra	30,67±2,12	34,50±1,83
MAC 8	31,13±2,70	31,00±2,61
4-m- MAC 8	29,75±1,97	30,86±2,34
MAC 16	30,13±2,53	31,86±2,51
4-m-MAC 16	28,75±2,76	33,17±2,09
MAC 18	29,50±2,81	30,88±2,68
BITC	29,00±1,35	28,75±1,44
4-m-BITC	29,50±0,65	29,50±0,29
BOH	31,25±2,10	32,00±1,87
BCHO	33,00±0,82	32,00±0,71
4-m-BNH2	30,25±1,11	30,25±0,95
BNH2	30,25±0,63	29,25±0,63
BCN	28,50±0,87	27,50±0,29

Tabla A7: El tránsito de los espermatozoides hacia la cabeza-cuerpo y la cola se ve afectado por el tratamiento con BITC (^aP<0.001; ^bP<0.05 respecto al grupo control). Los datos son medias ± error Standard.

Tratamiento	Transito cabeza-cuerpo (días)	Tránsito cola (días)
Control	2,97±0,33	4,21±0,21
Maca Negra	3,96±0,78	5,38±1,03
Mac 8	3,63±1,00	3,77±0,49
Mac 16	3,08±0,59	4,63±0,46
4 m- Mac 8	2,42±0,32	3,01±0,75
4 m- Mac 16	2,55±0,41	3,82±0,52
Mac 18	2,70±0,40	4,67±0,64
BITC	4,83±0,56 ^a	8,25±1,78 ^b
4-m-BITC	3,96±0,13	4,29±0,59
BOH	4,14±0,47	4,85±0,49
BCHO	3,68±0,34	6,24±0,62
4-m-BNH2	3,86±0,30	3,87±0,40
BNH2	3,18±0,40	4,38±0,37
BCN	2,87±0,33	4,10±0,21