

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN MACA (*Lepidium meyenii*) DURANTE EL SECADO EN HORNO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGISTER EN QUÍMICA**

AUTOR

ALMA ZURI RIOS ZÚÑIGA

ASESOR

ERIC GABRIEL COSIO CARAVASI

San Miguel, 2018

RESUMEN

El estudio de *Lepidium meyenii* (maca), una planta de uso ancestral en los Andes peruanos, ha revelado moléculas de interés por su actividad biológica y un importante valor nutricional. Desde el descubrimiento del papel del tratamiento post cosecha de maca en la formación de las macamidas (metabolitos bioactivos), se conducen nuevas investigaciones para desarrollar un procesamiento que resulte en un producto más estandarizado. En este estudio se intenta caracterizar el metabolismo de los ácidos grasos asociado al proceso post cosecha de maca como parte de la compleja serie de reacciones involucrada en la formación de amidas, en la búsqueda de estrategias para la obtención de un producto (maca seca) con una composición estandarizada. Con este fin se evalúa los efectos de la temperatura de secado sobre el catabolismo de lípidos de reserva, a través de la cuantificación de ácidos grasos, bencilamina y macamidas, y se encuentra que la liberación de ácidos grasos, a partir de lípidos de reserva, depende primariamente del contenido residual de agua en los tejidos y no de la acción de la temperatura. Las relaciones molares entre ácidos grasos libres y bencilamina no muestran una correlación con la tasa de formación de macamidas. Se observa que los ácidos grasos oxidados generados tienen oxidaciones exclusivamente en el carbono 12 y se evalúa adicionalmente la cinética de oxidación de ácidos grasos encontrándose que las oxidaciones pueden alcanzar mayor proporción a 25°C y menores tasas de velocidad de secado. De los parámetros de secado evaluados se concluye que la temperatura y humedad pueden emplearse para controlar las oxidaciones de ácidos grasos, sin embargo la tasa de formación de macamidas muestra ser independiente de las temperaturas y condiciones de secado evaluadas.

Contenido

RESUMEN	II
ABREVIATURAS.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.	2
3. OBJETIVOS.....	2
3.1. <i>Objetivo general.....</i>	2
3.2. <i>Objetivos específicos.</i>	3
4. MARCO TEÓRICO.....	3
4.1. <i>Maca</i>	3
4.2. <i>Composición de maca y propiedades biológicas asociadas.</i>	4
4.2.1. <i>Macamidas</i>	6
4.2.2. <i>Glucosinolatos.....</i>	6
4.2.3. <i>Ácidos grasos en maca.....</i>	8
4.2.3.1. <i>Macaenos.....</i>	8
4.3. <i>Metabolismo de lípidos en plantas</i>	9
4.4. <i>Oxidación de ácidos grasos.....</i>	6
4.4.1. <i>Lipoxigenasas.....</i>	12
4.5. <i>Tratamiento de post cosecha de maca</i>	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1. <i>Reactivos, materiales, instrumentos, equipos y software.....</i>	15
5.1.1. <i>Reactivos.....</i>	15
5.1.2. <i>Materiales.....</i>	15
5.1.3. <i>Instrumentos, equipos y software.....</i>	15
5.2. <i>Métodos.....</i>	16
5.2.1. <i>Material biológico.....</i>	16
5.2.1.1. <i>Muestreo.....</i>	16
5.2.2. <i>Estandarización de los parámetros de secado.</i>	17
5.2.3. <i>Secado de maca en horno.....</i>	17
5.2.4. <i>Procesamiento de maca.....</i>	17
5.2.4.1. <i>Maca en rodajas</i>	17
5.2.4.2. <i>Maca rallada.....</i>	18
5.2.5. <i>Determinación de la humedad.....</i>	18
5.2.6. <i>Extracción de maca para macamidas, aminos y ácidos grasos libres.....</i>	18
5.2.7. <i>Extracción de ácidos grasos libres de maca.....</i>	19

5.2.8.	<i>Lípidos totales</i>	19
5.2.9.	<i>Separación de los ácidos grasos por cromatografía de capa fina</i>	19
5.2.10.	<i>Ácidos grasos totales</i>	20
5.2.11.	<i>Derivatización de ácidos grasos</i>	20
5.2.12.	<i>Determinación de bencilamina</i>	21
5.2.13.	<i>Condiciones Cromatográficas</i>	21
5.2.13.1.	<i>Macamidas y ácidos grasos libres</i>	22
5.2.13.2.	<i>Ácidos grasos totales, libres y oxidados</i>	23
5.2.13.3.	<i>Bencilamina</i>	24
6.	RESULTADOS	25
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
8.	CONCLUSIONES	45
9.	SUGERENCIAS	46
10.	BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	<i>Composición de la maca comercial empleada</i>	51
Anexo 2.	<i>Cromatogramas de fracción lipídica</i>	52
Anexo 3.	<i>Recuperación de los procedimientos de extracción</i>	53
Anexo 4.	<i>Formación de macamidas en los experimentos de secado</i>	54
Anexo 5.	<i>Valores acumulados de ácidos grasos, bencilamina y macamidas</i>	55
Anexo 6.	<i>Curvas de calibración para la cuantificación de ácidos grasos, bencilamina y amidas</i> 56	
Anexo 7.	<i>Estabilidad del producto de derivatización DEEMM</i>	59
Anexo 8.	<i>Detalles de los espectros de masas de las sustancias identificadas</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1:	HIPOCOTILOS DE MACA	3
FIGURA 2:	ESTRUCTURA DE MACAMIDAS MÁS ABUNDANTES	6
FIGURA 3:	DESCOMPOSICIÓN DE GLUCOSINOLATOS.....	7
FIGURA 4:	ESTRUCTURA DE LOS MACAENOS.....	9
FIGURA 5:	ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN CON DEEMM	21
FIGURA 6:	SECADO DE MACA A DIFERENTES TEMPERATURAS	25
FIGURA 7:	EFFECTO DEL PROCESAMIENTO DE MACA RALLADA Y EN RODAJAS.....	26
FIGURA 8:	CINÉTICA DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LOS EXPERIMENTOS DE SECADO.....	28
FIGURA 9:	METABOLITOS TOTALES ACUMULADOS.....	29
FIGURA 10:	LIBERACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS EXPERIMENTOS DE SECADO.....	30

FIGURA 11: GENERACIÓN DE BENCILAMINA EN LOS EXPERIMENTOS DE SECADO	32
FIGURA 12: CARACTERIZACIÓN UV DE LOS ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS EN LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA MACA.....	35
FIGURA 13: ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS DETECTADOS EN LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA MACA.....	36
FIGURA 15: ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS EN LA CINÉTICA DE 25°C /CD.....	37
FIGURA 14: PORCENTAJE DE OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS RELACIONADO A LA TEMPERATURA Y TASA DE SECADO.....	38
FIGURA 16: SITIOS PREFERENTES DE REMOCIÓN DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO LINOLEICO.....	42
FIGURA 17: SITIOS PREFERENTES DE REMOCIÓN DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO LINOLÉNICO	43
FIGURA 18: CROMATOGRAMAS DE CAPA FINA DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA.....	52
FIGURA 19: FORMACIÓN DE MACAMIDAS EN EXPERIMENTOS DE SECADO	54
FIGURA 20: ESTABILIDAD DE DERIVATIZACIÓN DE BENCILAMINA.....	59
FIGURA 21: CROMATOGRAMA DE ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS	60
FIGURA 22: ESQUEMA DE FRAGMENTACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: COMPOSICIÓN DE LA MACA	5
TABLA 2: COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE DIFERENTES TEJIDOS DE ALMACENAMIENTO.....	8
TABLA 3: COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS EN TEJIDOS DE ALMACENAMIENTO DE PLANTA.....	10
TABLA 4: FACTORES QUE AFECTAN LA OXIDACIÓN LIPÍDICA.....	11
TABLA 5: ALGUNOS ROLES FISIOLÓGICOS DE LOS DERIVADOS DE LOX EN PLANTAS.....	13
TABLA 6: PARÁMETROS DE SECADO EVALUADOS.....	17
TABLA 7: EFECTOS DEL PROCESAMIENTO A LAS 24 HORAS.....	26
TABLA 8: PARÁMETROS DE SECADO EMPLEADOS.....	27
TABLA 9: PARÁMETROS DE AJUSTE DE LAS CURVAS DE SECADO	27
TABLA 10: MATRIZ DE CORRELACIÓN ENTRE EL RATIO MOLAR (BNH ₂ /AG) Y TASA DE FORMACIÓN DE MACAMIDAS.....	33
TABLA 11: COMPOSICIÓN DE FRACCIÓN LIPÍDICA	34
TABLA 12: MATRIZ DE CORRELACIÓN ÁCIDOS GRASOS Y SUS DERIVADOS OXIDADOS EN LA CINÉTICA 25°C.....	37
TABLA 13: COMPOSICIÓN DE MACA COMERCIAL EMPLEADA.....	51

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Eric Cosio por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia y la experiencia transmitida.

A Eliana Esparza responsable de mi introducción en la investigación en maca, por su generosidad, tiempo y paciencia que van más allá de la responsabilidad.

A los miembros del Laboratorio de Bioanalítica especialmente a Fabian Limonchi por su orientación y apoyo en el uso del GC/MS. Gracias por hacer entretenidos los días de rutina, aprendí mucho de todos, incluso de sus cuadernos de laboratorio.

A Ciencia Activa del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). Programas de Maestría en Universidades Peruanas. Convenio 035-2015 FONDECYT, por haber financiado mis estudios en el programa de Maestría en Química de la PUCP.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), Proyecto N° 17212-2016, "MODULACIÓN METABÓLICA DEL PROCESAMIENTO POSTCOSECHA DE LA MACA PARA SU ENRIQUECIMIENTO EN AMIDAS Y OTROS COMPUESTOS DE INTERÉS NUTRACÉUTICO", por su el apoyo en los fondos para los materiales y reactivos utilizados en la tesis.

A mi familia, que parece crecer cuando crecen mis tareas.

A mis amigos por dejarme pasar cada vez que olvido las llaves.

ABREVIATURAS

BCN: Bencilnitrilo.

BITC: Bencilisotiocianato.

DEEMM: Di-etil-etoxi-metil-malonato.

ESI/HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución por inozación en spray.

ESI/MS: Espectrometría de masas por ionización en spray.

GC/MS: Cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.

HPLC/MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas.

HPLC/UV: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector ultravioleta.

LC/MS: Cromatografía líquida acoplada a un detector de masas.

MSTFA: N-metil- N-trimetilsilil-trifluoroacetamida.

R_f: Coeficiente de reparto.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

UV/DAD: Para referirse a la detección ultravioleta con arreglo de diodos.

1. Introducción

Por su empleo ancestral e interés comercial, las moléculas presentes en hipocotilos de *Lepidium meyenii* (maca) y su relación a los efectos biológicos atribuidos (Wang et al., 2007; Gonzales et al., 2014) llevan años investigándose. Los glucosinolatos, las macamidas y los macaenos resaltan entre las moléculas bioactivas presentes en maca, (Zheng et al., 2000; Almukadi et al., 2013; Wu et al., 2013; Yang et al., 2016). Las macamidas y los macaenos han sido propuestos como marcadores de calidad para estandarizar la comercialización de maca (Ganzera et al., 2002).

Luego de las recientes investigaciones del metabolismo de post cosecha (Esparza et al., 2015; Pan et al., 2015; Chen et al., 2017), y de demostrarse que las macamidas son producto del proceso post cosecha de maca (Esparza et al., 2015), han surgido nuevas incógnitas sobre los mecanismos involucrados en la formación de macamidas.

Según las investigaciones de Esparza et al. (2015), el aumento de la tasa de ácidos grasos libres y bencilamina, productos de la degradación de lípidos y glucosinolatos respectivamente, está correlacionado con la formación de macamidas. Además, la combinación de daño tisular, deshidratación y variación de temperaturas, que tienen lugar en el proceso post cosecha tradicional, probablemente desencadenen procesos enzimáticos, aunque los mecanismos, las enzimas involucradas y su papel en la formación de macamidas en maca se desconocen.

Del metabolismo de glucosinolatos existen reportes de la conversión de sus productos de degradación a bencilamina en otras plantas distintas de maca (Halkier y Gershenzon, 2006). Sin embargo, se desconoce el papel de factores como temperatura, pH, humedad y microorganismos en la conversión entre glucosinolatos y derivados (bencilamina, bencilnitrilo, bencilisotiocinato) (Esparza et al., 2015).

Los ácidos grasos en maca han sido objeto de estudio (Dini et al., 1994; Zheng et al., 2000) desde un punto de vista exploratorio. Luego de las investigaciones sobre el proceso post cosecha de maca de Esparza et al. (2015), el estudio de ácidos grasos recibió un nuevo enfoque.

Los ácidos grasos en plantas se encuentran primariamente constituyendo diferentes lípidos complejos de almacenamiento, o que forman parte de membranas celulares. Los mecanismos de senescencia que se activan durante la cosecha desencadenan la degradación de lípidos, involucrando a su vez la hidrólisis de lípidos (triglicéridos y

fosfolípidos) a ácidos grasos libres y la formación de derivados oxidados (llamados macaenos).

Se sabe poco de la presencia de macaenos (ácidos grasos oxidados de maca), o de su relación con el proceso de post cosecha en maca. Se desconoce si el proceso de formación de derivados oxidados está relacionado a la formación de macamidas (como macamidas oxidadas), o si es un proceso independiente (Shrestha et al., 2003). Aunque la temperatura y disponibilidad de oxígeno pueden influir en la oxidación de ácidos grasos, la velocidad de deshidratación e inactivación enzimática su papel en la oxidación en maca no es claro. No se ha estudiado si el comportamiento de los derivados oxidados en maca está asociado a enzimas o si estos derivados son meros productos de auto oxidación, aunque ambos mecanismos han sido observados en otros alimentos (Frankel, 2014). No se encontraron reportes de asociación directa entre estos derivados oxidados de maca y algún efecto biológico.

Es importante entender el metabolismo de los ácidos grasos asociado al proceso de post cosecha de maca porque nos proporciona información (a través de: efectos de temperatura, relaciones molares, derivados oxidados) de su papel en los complejos procesos involucrados en la formación de amidas, proporcionando pistas acerca de posibles estrategias para la obtención de un producto (maca seca) con una composición estandarizada de macamidas.

2. Formulación del problema.

¿Cómo es el metabolismo de ácidos grasos durante el secado en horno de maca? ¿Cómo se relaciona con la formación de macamidas?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar el metabolismo de ácidos grasos de maca durante el secado en horno y su relación con la formación de macamidas.

3.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar los efectos de la temperatura de secado sobre el catabolismo de lípidos de reserva.
2. Evaluar las relaciones molares de ácidos grasos libres a bencilamina y su relación con la tasa de formación de macamidas.
3. Caracterizar preliminarmente los principales ácidos grasos oxidados generados durante en el secado en horno.
4. Evaluar la cinética de formación de ácidos grasos oxidados durante el secado.

4. Marco teórico

4.1. Maca

Lepidium meyenii Walp. (Maca) es un tubérculo de la familia de las Brassicaceae de consumo típico en la sierra central de Perú. La planta tiene hojas volantes en forma de roseta y un órgano de almacenamiento subterráneo, formado por la raíz principal y el hipocotilo, que varía en forma y color (blanco, amarillo, rojo o negro). La Figura 1 muestra los típicos hipocotilos de variedad amarilla. Ésta es cultivada bajo condiciones agrestes típicas de la región Puna: 3800 a 4500 m.s.n.m., terrenos no arbolados, áridos



Figura 1: Hipocotilos de maca

y rocosos, con alta radiación solar, fuertes vientos, frecuentes heladas y temperaturas menores a cero grados Celsius (Quirós y Aliaga, 1997).

Aunque su uso es histórico (por reportes de consumo pre colombinos), su consumo se empezó a extender por la popularización de sus propiedades sobre el aparato reproductor. La demanda por el consumo y exportación la llevó a figurar como uno de los casos más emblemáticos de

biopiratería (China). En el país, los mayores centros de producción se encuentran en los departamentos de Junín y Pasco, en el pasado su cultivo se extendía por Huancavelica, Apurímac, Puno, Huánuco, Ayacucho, Arequipa, La Libertad y Cajamarca (Quirós y Aliaga, 1997).

Los principales retos relacionados a la masificación del consumo de planta están en lograr un control de calidad o una forma de estandarización por la discrepancia entre las propiedades biológicas asociadas y su variada composición (asociada al cultivo, tratamiento post cosecha y fenotipos color y origen).

4.2. Composición de maca y propiedades biológicas asociadas.

Los estudios de composición de hipocotilos de maca muestran una variada composición que, sobre todo en moléculas como glucosinolatos y macamidas, ha sido motivo de discrepancia. Se ha tratado de establecer una relación entre las variedades de color de maca, estrategias de cultivo y origen (sobre todo entre China y Perú) (Zhao et al., 2012), sin embargo no se ha llegado a un consenso. Existen esfuerzos, tanto nacionales como internacionales, por estandarizar el producto (procesos de cultivo y post cosecha) así como establecer protocolos de control de calidad (Chen et al., 2015; Hajdu et al., 2015).

La composición de la maca se ha analizado usando técnicas como HPLC/UV, HPLC/MS, GC/MS, ESI/MS, ESI/HRMS, RMN y otras. La Tabla 1 lista los metabolitos reportados en algunos de los estudios realizados sobre la composición de la maca.

Además de su valor nutricional, algunas investigaciones empíricas han revelado que la maca exhibe muchas actividades biológicas que se han estudiado *in silico* (Powers y Setzer, 2015; Liang et al., 2017), *in vitro* (Valentová et al., 2006; Wu et al., 2013; Zhang et al., 2017) e *in vivo*. La mayoría de las investigaciones se han realizado en extractos y otros preparados complejos de maca, por lo que es muy difícil atribuir las propiedades a una sola molécula. A continuación se menciona las moléculas que están relacionadas a las propiedades más estudiadas asociadas con la maca:

Asociados al sistema reproductor: Espermatogénesis, afrodisiaco, fertilidad desórdenes menstruales y sexuales (relacionada a macamidas y macaenos) (Clément et al., 2010), menopausia (esteroles) (Wang et al., 2007; Gonzales et al., 2014),

Asociados al sistema inmunológico: inmunomodulador (relacionada a polisacáridos de maca y alcaloides) (Zhang et al., 2016)

Tabla 1: Composición de la maca

Resultados de algunos estudios de composición de la maca (fresca o seca) (Contenido por cada 100 g de hipocotilo).

		Maca fresca	Maca seca
Metabolitos primarios			
Agua (g)		79.8 ^a	15.3 ^a
Proteínas (g)	18-19 aminoácidos, 7 aminoácidos esenciales. (Dini et al., 1994).	3.5 ^a	11.8 ^a , 8.87–11.6 ^c
Lípido total (g)		1.0 ^a	1.6 ^a , 1.09 ^b , 2.2 ^c
Cenizas (g)		2.5 ^a	5.0 ^a
Carbohidratos (g)	(23.4% sucrosa, 1.55% glucosa, 4.56% oligosacáridos, 30.4% polisacáridos)		54.6–60.0 ^c
Metabolitos secundarios			
Alcaloides	Macaridina, β-carbolinas, imidazolicos ^c .		
Macamidas			
Macaenos			
Glucosinolatos			
Esteroles	(β-sitosterol, campesterol, brassicasterol, estigmasterol) ^c		86,7% del Lípido total ^b
Calcio (mg)		37 ^a	247 ^a 150 ^c
Fósforo (mg)		0 ^a	83 ^a
Zinc (mg)			3.8 ^c , 584 ^b
Hierro (mg)		14.7 ^a	49.9 ^a 16.6 ^c , 72.3 ^b
Manganeso (mg)			0.8 ^c
Cobre (mg)			5.9 ^c 51,4 ^b
Sodio (mg)			18.7 ^c , 2600 ^b
Potasio (mg)			2050 ^c , 162 ^b
Níquel (mg)			7.9 ^b
Tiamina (mg)		0.20 ^a	0.20 ^a
Riboflavina (mg)		0.35 ^a	0.35 ^a
Vitamina C (mg)		2.1 ^a	2.5 ^a
Otros: éster de benzoato, ácido málico, y catequinas			

^b Tomado de (Valentová et al., 2006) , ^c (Jin et al., 2016), ^c Tomado de (Dini et al., 1994)

4.2.1. Macamidas

Éstas son amidas de ácidos grasos y n-bencilamina, pertenecen al grupo de las alcanidas, un conjunto de sustancias de gran variedad presente en plantas. Fueron mencionadas por primera vez en una patente de 1999 (Zheng et al., 2001).

Las macamidas son el grupo de moléculas más estudiado en maca, por su relación a la estimulación sexual y a los efectos sobre el sistema endocanabinoide (Boonen et al., 2012).

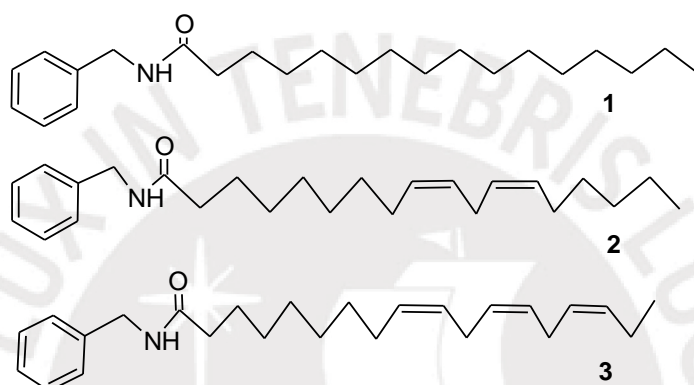


Figura 2: Estructura de macamidas más abundantes

1: (MAC 16) N- bencilhexadecanamida, 2: (MAC 18:2) N-benciloctadecadienamida y 3: (MAC 18:3) N- benciloctatrienamida.

Cuando los ácidos que forman las amidas están oxidados, estamos frente a oxo-macamidas o macamidas oxidadas.

La Figura 2 muestra las macamidas más abundantes en maca, las derivadas de ácido palmítico (MAC 16), linoleico (MAC 18:2) y linolénico (MAC 18:3).

Los estudios realizados por Ganzera *et al.* (2002) informan que la composición porcentual de los macaenos en una muestra de maca seca varía entre 0.09% y 0.45%, y la de macamidas de 0.06% a 0.52%.

4.2.2. Glucosinolatos

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios cuya aglicona es derivada de aminoácidos y comprende un residuo β -tioglucósido enlazado al carbono original a formando una cetoxima sulfatada. La modificación extensa de la cadena lateral y la elongación de los aminoácidos son responsables de la diversidad química de más de 120 estructuras reportadas. Los compuestos estables son normalmente almacenados

en vacuolas de la mayoría de tejidos en plantas. La pérdida de estructura celular inicia el rompimiento de los glucosinolatos catalizados por la enzima mirosinasa que hidroliza el enlace glicosídico generando derivados como se ilustra en la Figura 3.

Los glucosinolatos y sus derivados llaman la atención por su potencial como agentes de

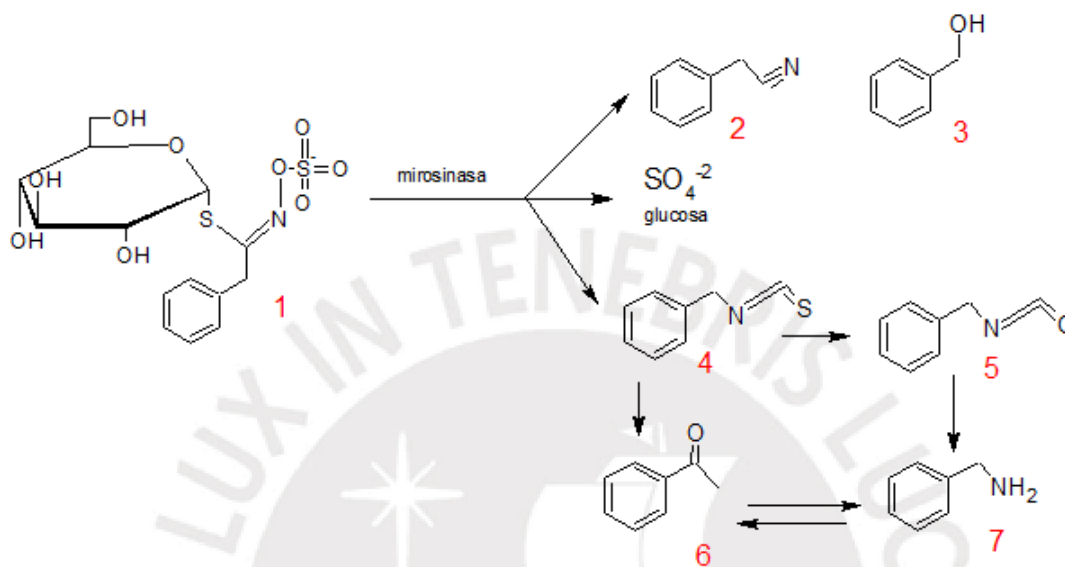


Figura 3: Descomposición de glucosinolatos

1: Benzilglucosinolato, 2: Benzilnitrilo, 3: Benzilalcohol, 4: Benzilisotiocianato, 5: Benzilisocianato, 6: Benzilaldehído, 7: Benzilamina. Adaptado de Esparza et al. (2015).

prevención de cáncer, compuestos de protección de cultivos y biofumigadores agrícolas para combatir patógenos y el cáncer (Fahey et al., 2001; Halkier y Gershenzon, 2006)

Los glucosinolatos en maca fresca representan alrededor del 1 % de su composición, que a comparación otras crucíferáceas (col, coliflor y brócoli) es, aproximadamente, 100 veces mayor.

Ningún glucosinolato reportado en maca es particular de ésta. Se han aislado nueve tipos de estos metabolitos aunque la mayoría son de tipo aromático. El glucosinolato mayoritario es benzilglucosinolato o glucotropeolina. La presencia combinada de glucotropeolina y m-metoxibenzilglucosinolato puede ser usada como un marcador quimiotaxonómico porque no se ha reportado en otras plantas.

La abundancia de glucosinolatos va en el orden de semillas, hipocotilos frescos y plántulas. Sin embargo, las semillas y plántulas difieren del perfil hipocotilos y hojas debido a la presencia de muchos benzilglucosinolatos modificados (Li et al., 2001).

Los glucosinolatos se encuentran en menor contenido en los hipocotilos de maca seca y productos procesados (después de la cosecha decrece en hipocotilos de frescos a secos 20% a 50% (Yábar et al., 2011), en comparación al tejido y semilla fresca; probablemente porque el tratamiento de post cosecha generaría una liberación de los metabolitos debido a que los glucosinolatos se pueden hidrolizar en presencia de la enzima mirosinasa cuando las células se dañan (Li et al., 2001).

En células intactas, los glucosinolatos permanecen separados de la enzima endógena mirosinasa; cuando el hipocotilo se deteriora, ambos entran en contacto y se produce la hidrólisis de los glucosinolatos que termina en la formación de isotiocianatos por el rearrreglo de Lossen, nitrilos o tiocianatos dependiendo del sustrato, pH, disponibilidad de los iones de hierro y presencia de proteínas específicas. Estos compuestos volátiles generados son tóxicos y han sido reportados como los responsables de la defensa de la planta frente a sus depredadores (Fahey et al., 2001).

Se han reportado productos que se forman por la inestabilidad de los isotiocianatos frente a procesos de oxidación o hidrólisis por el método de arrastre de vapor. En la composición de aceite esencial de maca se ha estudiado la presencia del bencilalcohol, benzaldehído y bencilnitrilo (Tellez et al., 2002). Se ha cuantificado la presencia de bencilamina libre en maca fresca y seca, y se estima que la misma aumenta considerablemente durante la post-cosecha en campo, debido a procesos hidrolíticos que tienen lugar (Esparza et al., 2015).

4.2.3. Ácidos grasos en maca

El interés inicial en los ácidos grasos de maca reside en su tasa de insaturados; aunque como se puede ver en la Tabla 2 éste es un patrón común en tejidos de almacenamiento.

Tabla 2: Composición de ácidos grasos de diferentes tejidos de almacenamiento

Tejido	Lípidos totales	Ácidos grasos (% de ácidos grasos totales)						Ratio ^φ
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Otros	
Bulbo de narciso	1.2*	17	1	9	69	3	1	0.23
Raíz de nabo	1.9*	15	2	8	14	59	2	0.23
Tubérculo de papa	0.5*	19	3	3	60	15	0	0.28
Bulbo de cebolla	3.1 ⁺	18	1	6	62	10	3	0.28
Raíz de chirivía	3.2 ⁺	12	1	8	60	7	12	0.33

*Porcentaje por peso seco ⁺Porcentaje por peso húmedo, ^φ Ratio de saturados/insaturados.

Los ácidos grasos linoleico y linolénico representan la mayoría de ácidos grasos presentes en maca (52.7–60.3% del total de ácidos grasos (Wang et al., 2007).

Los ácidos grasos libres en maca se van incrementando con el tiempo de post cosecha producto de la degradación de lípidos más complejos.

4.2.3.1. Macaenos

Existe una definición controversial de lo que es un macaeno, aunque muchos autores aluden a los macaenos como ácidos grasos insaturados oxidados (oxilipinas) detectados en maca (Muhammad et al., 2002). Esta denominación se originó al identificar ácidos grasos oxidados de particular estructura (sitios de oxidación no típicos), dichas estructuras se pueden apreciar en la Figura 4.

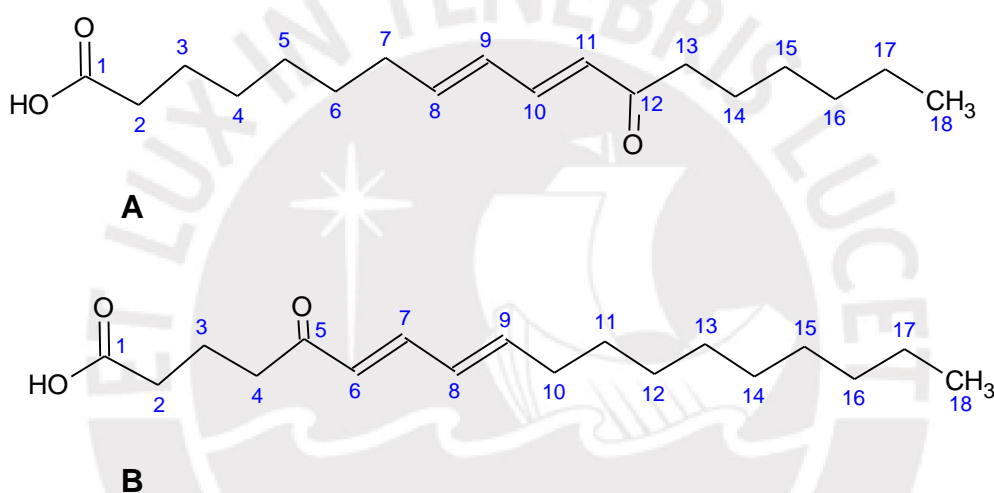


Figura 4: Estructura de los macaenos

A: 12-oxo, 8,10-ácido octadecenoico (8E, 10E) **B:** ácido 5-oxo- 6,8-octadecenoico (6E,8E)

Desde 2016 los macaenos reportados no son exclusivos de maca (Zhao et al., 2016).

No se han reportado derivados oxidados de ácidos grasos de maca con cadenas menores que 18 carbonos.

4.1. Metabolismo de lípidos en plantas

Los acil-lípidos son los mayores constituyentes de los tejidos en plantas. Estos se encuentran principalmente presentes como triacilgliceroles (Tabla 3) en semillas o en la parte carnosa de las frutas, donde actúan como almacenadores de alimento. Tejidos de almacenamiento como tubérculos, bulbos, mazorcas acumulan bajas cantidades de lípidos. En estos tejidos los mayores tipos de lípidos son fosfolípidos y glicolípidos, y ellos contienen la mayoría de ácidos grasos. Aunque la composición de lípidos varía de

alguna forma; el ácido palmítico, linoleico y linolénico son los más abundantes (Stumpf, 2014)

En el metabolismo de lípidos en plantas senescentes se presentan procesos degradativos de hidrólisis y oxidación. En general se ha visto rápidas pérdidas de lípidos que son componentes de cloroplastos, los glicerolípidos son rápidamente hidrolizados y el ácido linolénico liberado es particularmente susceptible a la oxidación catalizada por lipoxigenasa. El daño físico inicia una respuesta caracterizada por una aceleración de la síntesis de lípidos para formar una capa protectora inerte es formada alrededor de los daños (Stumpf, 2014).

Tabla 3: Composición de lípidos en tejidos de almacenamiento de planta ^φ.

Lípidos	Porcentaje por peso de lípidos totales			
	Papa	Manzana	Arvejas	Soya
MGD*	5.7	1.3	n.d. ²	Tr ^θ
DGD+	16.2	5.3	n.d.	Tr
SQD°	1.3	1.0	n.d.	Tr
Cerebrosido	2.4	5.2	n.d.	Tr
Esterilglucósido	2.0	5.4	n.d.	Tr
Esterilglucósido acilado	6.4	1.6	n.d.	Tr
Esterol	0.6	20.1	n.d.	Tr
Ésteres de esteroles	0.1	2.1	n.d.	Tr
Fosfatidilcolina	25.8	22.7	29.9	4.0
Fosfatidiletanolamina	12.6	10.7	18.2	2.0
Fosfatidilinositol	6.3	6.2	13.2	1.6
Fosfatidilglicerol	0.9	0.8	4.0	Tr
Fosfatidilserina	0.6	0.4	4.2	0.1
Ácido fosfatídico	0.3	0.7	4.2	0.1
Triacilglicerol	15.4	5.3	20.2	87.8
Otros	2.8	11.7	7.5	4.1

*MGD: Monogalactosil diglicérido, +DGD: digalactosildiglicérido, °SQD: Sulfoquinovosildiglicérido, ^θtr: trazas, ²n.d.: no se determinó

^φ Tabla adaptada de "The Biochemistry of Plants, Vol 4. Lipids: Structure and Function (Stumpf, 2014)"; pág. 21

Muchas enzimas hidrolíticas y oxidantes actúan sobre los lípidos en materiales crudos, cuando los tejidos son cortados o dañados. La acción de las enzimas ocurre secuencialmente con la hidrólisis inicial de triacilgliceroles o lipólisis catalizada por lipasas produciendo ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres poliinsaturados son oxidados por lipoxigenasas, que representan una importante cantidad de enzimas oxidantes encontrada en plantas y animales.

En plantas las lipasas y lipoxigenasas son las enzimas responsables de procesos de hidrólisis y oxidación, además de ser responsables por caracteres de sabor (Frankel, 2014).

Asociados al sistema reproductor: Espermatogénesis, afrodisiaco, fertilidad desórdenes menstruales y sexuales (relacionada a macamidas y macaenos) (Clément et al., 2010), menopausia (esteroles) (Wang et al., 2007; Gonzales et al., 2014),

Asociados al sistema inmunológico: inmunomodulador (relacionada a polisacáridos de maca y alcaloides) (Zhang et al., 2016)

Asociados al sistema nervioso central: estimular la memoria, efectos cannabinomiméticos (Hajdu et al., 2014) (asociado a macamidas)

Cáncer: Actividad quimioprotectora de los vegetales. (relacionada a glucosinolatos esteroides, alcaloides y esteroides) (Gonzales et al., 2014).

4.2. Oxidación de ácidos grasos

Este proceso involucra inicialmente la abstracción de hidrógeno de un carbono con la inserción de un oxígeno formando un lípido de radical peróxido. Se observan oxidaciones enzimáticas que involucran una catálisis enzimática y dan productos estereo y regio específicos; las oxidaciones no enzimáticas no forman productos específicos. Los ácidos grasos insaturados que contienen el sistema 1,3 pentadienil sufren una abstracción de hidrógeno más fácil del grupo alílico CH_2 doble.

La Tabla 4 (en la siguiente página) resume los factores que afectan la oxidación lipídica y algunos mecanismos para regularla.

Tabla 4: Factores que afectan la oxidación lipídica

ACELERADO POR	INHIBIDO POR
Alta temperatura	Refrigeración
Luz (UV Azul)	Oscuridad
Radiación ionizante (α, β, γ)	Contenedores o envoltorios
Peróxidos	Exclusión de oxígeno
Lipoxigenasa	Blanqueado (inhibición enzimática)
Catálisis por hierro orgánico	Antioxidantes
Catálisis por metales en trazas	Agentes quelantes

Tabla adaptada de Lieberman, 1983.

En contraste con la oxidación enzimática, la oxidación no enzimática por radicales libres es rápidamente inhibida por antioxidantes. Los granos y aceites de cereal germinado no dañados son estables a oxidación por el tocoferol que contiene. Sin embargo el tocoferol es descompuesto durante el almacenamiento. Ciertos pasos pueden incrementar la susceptibilidad de los granos a la oxidación descomponiendo tocoferoles, alterando el grano, redistribuyendo los lípidos y exponiéndolos a metales catalíticos. Las

metaloproteínas naturales en los cereales pueden también ser activados durante el procesamiento térmico en presencia de humedad para catalizar oxidación. (Frankel, 2014). En general las temperaturas menores favorecen las oxidaciones enzimáticas y las temperatura mayores las oxidaciones no enzimáticas (Frankel, 2014).

Tres rutas son las principales que generan mediadores de señalización de lípidos oxidados: La ruta de las lipoxigenasas, ciclooxigenasa y citocromo P450.

En el primer paso el ácido graso libre es oxidado por un oxígeno molecular y se produce un ácido graso hidroperoxidado. Esta reacción puede ser catalizada tanto por una lipoxigenasa (LOX) como por una dioxigenasa (DOX). Los productos de las dioxigenasas se descomponen no enzimáticamente en CO₂ y derivados aldehídicos cortos o alternativamente son reducidos químicamente por glutatión o por peroxigenasa (PXG). En contraste los productos hidroperoxidados formados por LOXs se han mostrado relativamente estables y son metabolizados más profundamente por otras enzimas como miembros especiales del grupo P450, la familia Cyp74: aleno oxido sintasa (AOS), hidroperóxido liasa (HPL) y divinil éter sintasa (DES), PXG o epoxialcohol sintasas (EAS) (Demidchik, 2015).

4.2.1. Lipoxigenasas

Son enzimas selectivas para ácidos grasos poliinsaturados que contienen la fracción cis,cis-1,4-pentadieno para producir tanto 9S-hidroperóxidos como 13R-hidroperóxido o una mezcla de ambos (Frankel, 2014).

Muchas isoenzimas de lipoxigenasa son conocidas incluyendo la L-1 y L-2 de soya, con pH óptimo de 9.0 y 6.5, respectivamente. Las isoenzimas L-1 con alto pH óptimo prefieren ácidos grasos libres aniónicos, y L-2 con pH optimo cerca al neutro prefieren sustratos neutros como TAG L-1 y producen 13R-hidroperóxidos estereoselectivamente de ácido linoleico, mientras que L-2 produce una mezcla de 9- y 13-hidroperoxidos de linoleico y linoleico glicéridos. Esta isoenzima L-2 no requiere una lipólisis de TAG previa para ser activa en alimentos. L-2 puede cooxidar carotenos y clorofila en productos en color (Frankel, 2014). Muchos son los roles fisiológicos que se le atribuyen a estas enzimas, la Tabla 5 (página siguiente) muestra los más destacados.

Tabla 5: Algunos roles fisiológicos de los derivados de LOX en plantas.

Fenómeno	Notas	Compuestos involucrados
Resistencia de plantas a patógenos	Activación de distintos sistemas de defensa en "respuesta hipersensitiva". La expresión de LOX rápidamente inducidas seguida la infección	Ácido jasmónico, fitoalexinas, (e.g. hexenal); eicosanoides de araquidonato.
Movilización de lípidos de almacenamiento	13 lipoxigenasa inducidos, translocado a cuerpos lipídicos y lípidos de almacenamiento dioxigenados, los cuales son después hidrolizados y el ácido graso oxidado es catabolizado.	Lípidos 13 hidroperoxidados
Inducción de la formación de tubérculo	Estimula un número asociado de fenómenos, como expansión celular, estructura de cito esqueleto y acumulación de carbohidrato.	Ácido tuberónico y otras jasmoninas

Tabla adaptada de (Gunstone et al., 2007) pág. 657

4.1. Tratamiento de post cosecha de maca

La cosecha de la maca es anual (Quiros y col., 1996). Sin embargo, se considera como una planta bienal, porque luego del ciclo vegetativo, experimenta una fase reproductiva de 4 a 6 meses. La fase vegetativa es el tiempo de expansión y crecimiento del hipocotilo y raíz y tiene una duración de 8 a 9 meses aproximadamente, mientras que la fase reproductiva es la temporada de producción de semillas. Luego de las temporadas de heladas, los hipocotilos conservados bajo el suelo por aproximadamente 2 meses son trasplantados para cumplir su ciclo reproductivo. Ambas fases concuerdan con el inicio de la temporada de lluvias en los Andes centrales (León, 1964).

Las raíces son cosechadas, cuando los hipocotilos alcanzan un máximo tamaño. Luego, para acelerar el proceso de senescencia foliar, los hipocotilos se colocan en costales para acortar la vida post-cosecha de las hojas para en un primer periodo redistribuir de forma ordenada y controlada los nutrientes liberados (degradación de cloroplastos, proteínas, etc., exportación de nitrógeno) desde las células del órgano senescente hacia los órganos en desarrollo o sitios de reserva (semillas, tubérculos, etc.) y, una vez

completado dicho proceso, inducir a un proceso de muerte celular (Guiamet, 2004; Gomez, 2012; Hadzich, 2016).

Posteriormente los hipocotilos se dejan bajo el sol para ser secados por la incidencia de radiación ultravioleta (UV) intensa. Para obtener las semillas después de la cosecha, las plantas más fuertes se dejan expuestas a fuertes heladas en el campo durante un mes. Luego, son trasplantadas a parcelas especiales, donde son cubiertas por tierras abonadas para obtener flores después de 3 a 4 meses (National Research Council, 1989; Hadzich, 2016).

El secado tradicional de maca es de duración variable, ya que el clima y tamaño de los hipocotilos también es variado. Luego de ser cosechadas, las macas frescas son transportadas a la zona de secado, a 4200 m.s.n.m., donde la temperatura asciende hasta un promedio de 28°C durante el día, y desciende en la noche hasta los -10°C aproximadamente (Aliaga, 1999; Hadzich, 2016).

Las macas se colocan sobre mantas arpilleras de plástico o costales, los cuales se emplean para cubrir el cultivo durante las noches y evitar el deterioro de los hipocotilos, los cuales están expuestos a procesos de condensación y congelación, originados por el clima de la región. Son volteadas con la ayuda de un rastrillo para evitar su putrefacción y homogenizar la exposición de los hipocotilos al sol (Hadzich, 2016).

Una vez que pierden sus hojas, aproximadamente luego de 4 a 8 semanas expuestas a radiación intensa, son sacudidas en mallas para retirar la mayor cantidad de tierra y hojas secas presentes y separar aquellas cuyo tamaño aproximadamente es menor a 1,8 cm, y son colocadas sobre las mantas bajo fitotoldos, armazones de madera asegurados al suelo y cubiertos con plástico transparente, para concentrar y optimizar el calor solar al interior y conseguir un secado rápido y uniforme. Si se requiere separar por tamaño, se emplean mallas para tamizado (Hadzich, 2016).

Existen plagas específicas que dañan el cultivo de la maca. Entre las más destacadas se encuentran “la mosca o gusano de la raíz” (*Delia brassicae*), la cual daña al hipocotilo de manera superficial con raspaduras helicoidales, y “la cochinilla harinosa” o “Perla del suelo” (*Margarodes vitium*), responsable de deformaciones en el hipocotilo y formación de costras de tierra adheridas al mismo por presencia de azúcares y ceras segregados por el insecto. Estas últimas pueden también ser precursores de infecciones fúngicas (Bravo, 2001). Asimismo, se puede destacar la presencia de pulgones, gorgojos y hongos, los cuales atacan a las hojas de la maca, plaga conocida como “pluma blanca” (Aliaga y col., 2007).

5. Materiales y métodos

5.1. Reactivos, materiales, instrumentos, equipos y software.

5.1.1. Reactivos

Agua purificada Tipo I; JT Baker (Phillipsburg, EE.UU.): cloroformo (CHCl_3), etanol (EtOH), acetonitrilo (ACN), acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (CH_2Cl_2); Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, EE.UU.) metanol (MeOH) Merck (Darmstadt, Alemania): ácido fórmico LC/MS, 98-100%, acetonitrilo (ACN) LC/MS.

JT Baker (Phillipsburg, EE.UU.): ácido acético glacial, ácido clorhídrico (HCl), Hidróxido de potasio (KOH); Merck (Darmstadt, Alemania): bencilamina (BNH_2) carbonato de sodio (Na_2CO_3); Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania): ácido linoleico (AG 18:2), ácido linolénico (AG 18:3); Yodo.

Praxair (Callao, Perú): Nitrógeno (UHP); AGA (Callao, Perú): Helio (UHP, 5.0), Nitrógeno líquido.

5.1.2. Materiales

Se procuró emplear material calibrado y libre de suciedad u otros contaminantes.

E.Merck: placas de Silica Gel 20x20 F254; cámara de revelado; pipetas (1mL, 2mL y 5mL de capacidad); papel filtro; micropipeta; Eppendorf^(b)/Isolab: puntas para micropipeta; fioles, vasos de precipitado, probetas; placas Petri.

Agilent (Santa Clara, EE.UU.): columna de HPLC, ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1x50mm 1.8 μm . Merck (Darmstadt, Alemania): columna de HPLC, LiChrospher 250x4mm, RP-18 columna de HPLC, LiChrospher 125x4mm.

5.1.3. Instrumentos, equipos y software

Se procuró emplear material calibrado y libre de suciedad u otros contaminantes. Agilent (Santa Clara, EE.UU.): HPLC Agilent 1200 con horno termostático para columnas G7116A, bomba cuaternaria G7111A, e inyector automático G7129A, detector DAD G7117C. Chem Station for LC 3D systems. RREV.B.01.03-SR2 (204). Agilent Technologies; Bachofer (Reutlinger, Alemania): Centrífuga D-7410; Büchi (Flawil, Suiza): Rotavapor; Data Analysis versión 4.0 (Build 234); Emerson Motor Division (Saint Louis, EE.UU.): Bomba de vacío SA55JXGTD-4144; Eppendorf (Hamburgo, Alemania): Microcentrífuga 5417C; Hanna Instruments (Rhode Island, EE.UU.) Termómetro electrónico modelo EITH WP;

IKA Works (Carolina del Norte, EE.UU.) Vórtex de agitación MS1 Molinillo analítico basic IKA A11 Kendro, Productos de Laboratorio (Langensfeld, Alemania) Centrífuga refrigerada Heraeus® Biofuge Stratos; Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG. (Berlin, Alemania) pHmetro 766 Calimatic® con cable de alimentación y electrodo de pH/Pt 1000 SE 100 (vidrio, 165 mm). Merck – Hitachi (Tokio, Japón) National Institute of Standards and Technology (Maryland, EE.UU) NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Versión 2.0.; Pace Scientific (Carolina del Norte, EE.UU) Pierce (Rockford, EE.UU.) Bloque termostático con agitación magnética, Reacti-Therm™ unidad de evaporación y módulo de calentamiento y agitación. Precision Scientific Inc. (Illinois, EE.UU.) Incubadora económica, Variación de temperatura: 5 a 65°C Sartorius (Goettingen, Alemania); Balanza analítica BP-210S; Systat Software GmbH (Erkrath, Alemania) SigmaPlot versión 11.0 Taylor-Wharton Cryogenics (Alabama, EE.UU.) Envase criogénico (Dry Shipper), Serie CX-100 (Cryo Express) Thermo Electron Corporation (Ueberlingen, Alemania) Software de espectrómetro UV-VIS, VISIONlite™ versión 2.1; Waters - Millipore (Billerica, EE.UU.) Estación de procesamiento para SPE, Sep Pak Vacuum Manifold, para 12 cartuchos; Branson® CPXH Ultrasonic Cleaning Bath – Modelo 5800; Advanced Chemistry Development Inc. (Ontario, Canadá) ChemSketch 2016.2.2 (File Version C30E41, Build 90752, 20 Dec 2016); ImageJ Image processing and analysis in java, versión 1.51j8, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA , Java 1.8.0 _112(64-bit), 19MB of 4521MB (<1%).

5.2. Métodos

5.2.1. Material biológico

Se empleó hipocotilos de maca, variedad amarilla que pesan entre 35 g - 50 g. Los hipocotilos fueron adquiridos en el mercado de Ciudad de Dios, San Juan de Miraflores (Lima). Detalles de la composición de los hipocotilos empleados se muestran en el Anexo 1.

5.2.1.1. Muestreo

Se tomó dos muestras cada dos horas, se rotularon (Temperatura (25, 30,40) Hora (0-48) Réplica (1, 2,3).) adecuadamente. Las muestras tomadas se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un contenedor criogénico hasta su análisis.

Antes de su extracción se juntaron las tres muestras, se molieron en frío con un molinillo y se extrajeron por triplicado.

5.2.2. Estandarización de los parámetros de secado.

Se realizaron ensayos iniciales para determinar los intervalos de tiempo y temperaturas necesarios para alcanzar un peso seco final de 30% comparado al inicial.

Las pruebas se realizaron a 40°C. Se procedió a evaluar 2 tipos de procesamiento de maca: rodajas (5.2.4.1 Maca en rodajas) y rallado (5.2.4.2 Maca rallada).

La Tabla 6 resume los parámetros experimentales evaluados.

Tabla 6: Parámetros de secado evaluados

	Tipo de secado	
	Sin desecante	Sin desecante
Forma de procesamiento	Maca rallada	Maca rodajas
Temperaturas	40°C	40°C
Flujo de aire	Sin ventilador/ ventilador	con ventilador/ con
Tiempo de secado	48 horas	48 horas
Tamaño de hipocotilos	25 -35 g de peso	25 -35 g de peso

Se tomó tres muestras a las 24 horas de maca rallada y maca en rodajas, para comparar la formación de los metabolitos de estudio.

5.2.3. Secado de maca en horno

Se realizó tres ciclos de secado a temperaturas de 25°C, 30°C y 40°C, según los parámetros escogidos. Se tomó muestras por 48 horas. Se tomó tres muestras fijas y tres muestras aleatorias cada 2 horas, durante 48 horas. Se agrupó las rodajas de apariencia homogénea, el resto se descartó.

5.2.4. Procesamiento de maca

5.2.4.1. Maca en rodajas

Con una rebanadora doméstica se hizo rodajas de los hipocotilos, 3 mm de espesor (aproximadamente). Se agruparon tres rodajas (juntas pesaban alrededor de 15 g), de diámetro más parecido. Se formaron brochetas ensartando cada grupo de rodajas en pinchos de madera comerciales. Cada brocheta se etiquetó, se pesó, se registró el peso. Se colocó las brochetas en el horno, previamente equilibrado, a la temperatura de trabajo.

5.2.4.2. Maca rallada

Se ralló los hipocotilos con un rallador de cocina estándar. Se pesó 10.0 gramos de maca rallada en placas petri 60 x 15 mm (mini placas). Se colocó las placas con maca rallada en el horno, previamente equilibrado, a la temperatura de trabajo.

5.2.5. Determinación de la humedad.

Se pesó tres muestras fijas y dos muestras aleatorias (destinadas al análisis) según el programa de muestreo, durante 48 horas.

Para la humedad total: A las 48 horas, se calculó registrando el peso de tres muestras. Las muestras se secaron a 100°C por 30 minutos en horno y se dejaron atemperar por 30 minutos más en el desecador antes de registrar el peso.

5.2.6. Extracción de maca para macamidas, aminos y ácidos grasos libres.

El método fue adaptado del empleado por Esparza et. al (2015). Los hipocotilos almacenados en nitrógeno líquido se pulverizaron con un molinillo analítico basic IKA A11 criogénico y homogeneizados en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido. Se pesó 500 mg de maca en tubos de polipropileno herméticos, se agregó 5 mL de una solución de 70% MeOH a 70°C. Se burbujeó con nitrógeno gas antes de cerrar los tubos. Se expuso a baño de 80°C por 10 min , estudios previos (Van Eyllen et al., 2007) indican que la actividad de mirosinasa es estable a 40°C y reducido a 90% después de tratamiento térmico a 75°C por 10 minutos. Se sonicó a 50°C por 30 minutos, se centrifugó a 10 000 x g por 15 minutos, y el sobrenadante se filtró al vacío con membranas GF/A. La solución se recuperó en tubos de centrifuga, se burbujeó con nitrógeno y almacenó a -20°C. Se re-extrajo dos veces más en los mismos tubos de centrifuga bajo las mismas condiciones por 10 minutos. Se inyectó 40 uL por muestra. Para cuantificar la recuperación se agregó 100 uL de estándar equivalente a 160 ug/mL por ácido graso y amida.

5.2.7. Extracción de ácidos grasos libres de maca

Se empleó un método basado en el reportado por Bligh y Dyer (1959). Se pesó 0.5 g de muestra maca. Se añadió 1.5 mL de solvente (CHCl₃: MeOH 1:2; 0.01% BHT). Se añade 10 µL AG 13:0 1 mg/mL (estándar interno). Se agitó en el vórtex 3 segundos a 1000 RPM. Se añade 0.5 mL de cloroformo (CHCl₃). Se agitó en el vórtex 3 segundos a 1000 RPM. Se añade Agua 5% Cl₃COOH₃ de acuerdo a la humedad determinada para la muestra para que el volumen de agua presente en la solución esté en la proporción: Metanol, Cloroformo, Agua (2:2:1.8). Se agitó en el vórtex 5 segundos a 1000 RPM. Se filtró a través de un filtro GFA. El proceso se repitió una vez más y se añadió al extracto original. Se obtuvo un extracto bifásico metanol-agua y clorofórmico. Por decantación se separó la fase polar, se empleó la fase clorofórmica del extracto. Para determinar la recuperación se agregó 10 µL de estándar equivalente a 10 µg/mL por ácido graso C13:0 y MAC 16.

5.2.8. Lípidos totales

Aunque muchos autores discuten que se define cómo lípido, existe un común de acuerdo que considera que un lípido es lo que se disuelve en un solvente apolar (Pati et al., 2016).

Se molió tres hipocotilos previamente enfriados con nitrógeno líquido. Se pesó 5 g del polvo congelado. Se agregó 20 mL de MeOH: CHCl₃ (1:2). Se sonicó por tres horas (ambiente N₂). Se filtró con GFA. Se extrajo el bagazo sobrante con otros 20 mL. Se filtró con GFA el re extraído. Se incorporó el filtrado (primero y segundo) a un balón para rotaevaporar (previamente pesado) a sequedad. Se registró el peso (PESO 1). Se disolvió el extracto con 5 mL MeOH y 5 mL CHCl₃, la solución se transfirió a otro contenedor. Se rotaevaporó. Se registró el peso (PESO 2). La solución obtenida en el paso previo se almacenó en medio N₂ gas. La diferencia obtenida entre el PESO 1 y PESO 2 es el contenido total de lípidos para la muestra.

5.2.9. Separación de los ácidos grasos por cromatografía de capa fina

Emplear cromatografía de capa fina es un recurso barato y simple. La separación de la fracción de ácidos grasos y ácidos grasos oxidados de la fracción lipídica se hizo empleando cromatografía de capa fina. Se desarrolló la cromatografía con fase móvil (cloroformo: acetato de etilo, 4:1)

Se fotografió las placas empleando las lámparas de laboratorio (254 nm, 360 nm) y un revelador universal (yodo). Las imágenes fueron procesadas con ImageJ *Image analysis*

processing in java, un software que permite calcular el área de manchas y formas irregulares a partir del número de píxeles en imágenes. Se realizó una curva de calibración que asegure la relación área/concentración. Se identificó la naturaleza de las manchas empleando estándares disponibles en (macamidas, ácidos grasos, trioleína, carotenos). Las fracciones aisladas se analizaron por HPLC /UV para confirmar la naturaleza de los compuestos (según las condiciones cromatográficas para macamidas y ácidos libres (5.2.13.1)

5.2.10. Ácidos grasos totales

Se evaporó el solvente de 2 mL de la fracción clorofórmica. Se añadió 2 mL de HCl: TFA (2N). Se hidrolizó a 90°C por 1 hora. Se tomó 100 uL de la fracción CHCl₃. Se tomó 100 uL de la fracción clorofórmica para su derivatización con MSTFA. Se realizó la lectura por triplicado (Pati et al., 2016).

5.2.11. Derivatización de ácidos grasos.

La sililación es de lejos el proceso de derivatización más empleado para el análisis GC/MS. Los derivados sililados son formados cuando se produce un desplazamiento de un protón activo (en grupos -OH, -SH o -NH) por un grupo alquilsilil. En una investigación de Rontani et al. (2008) se demostró los efectos sinérgicos que involucra la transferencia de hidrógeno e trimetilsilil durante la fragmentación de masas de ionización de electrones de compuestos polifuncionales (hidroxi y oxocarboxílicos). El mismo autor propone las rutas de formación de fragmentos de masa para moléculas con dos grupos funcionales que no son encontradas para aquellas con un solo grupo funcional. Los fragmentos 204, 217, [M - 31]⁺, [M - 105]⁺ y [M - RCHO]⁺ son buenos marcadores de los derivados de ácidos oxocarboxílicos e hidrocarboxílicos (Rontani y Aubert, 2008).

Para su derivatización con MSTFA se tomó 100 uL de extracto (5.2.7 Extracción de ácidos grasos libres). Se evaporó todo el solvente en N₂ gas. Se colocó 10 uL de MSTFA. Se derivatizó por 30 minutos a 60°C. Se dejó enfriar y se añadió 90uL de CH₂Cl₂. Se inyectó 1 uL en el GC/MS, de acuerdo a las condiciones cromatográficas para ácidos grasos totales, libres y oxidados (5.2.13.2).

La eficiencia de extracción se controló con la cuantificación de la recuperación del estándar interno. La estabilidad de los derivados se controló en un intervalo de 4 horas después de la derivatización de la muestra.

5.2.12. Determinación de bencilamina

El empleo de di-etil-etoxi-malonato (DEEMM) ha sido sugerido para aminas biogénicas alifáticas y derivados aminados (Hermosín et al., 2003; Gómez-Alonso et al., 2007). La reacción tiene lugar en un medio ligeramente alcalino. En el caso del análisis de histamina (Bach et al., 2012), el estudio de estabilidad del derivatizado demuestra que es muy estable. La Figura 5 muestra un esquema de la reacción con DEEMM, Alaiz et al., 1989 publicó un mecanismo de acción detallado de la derivatización con DEEMM.

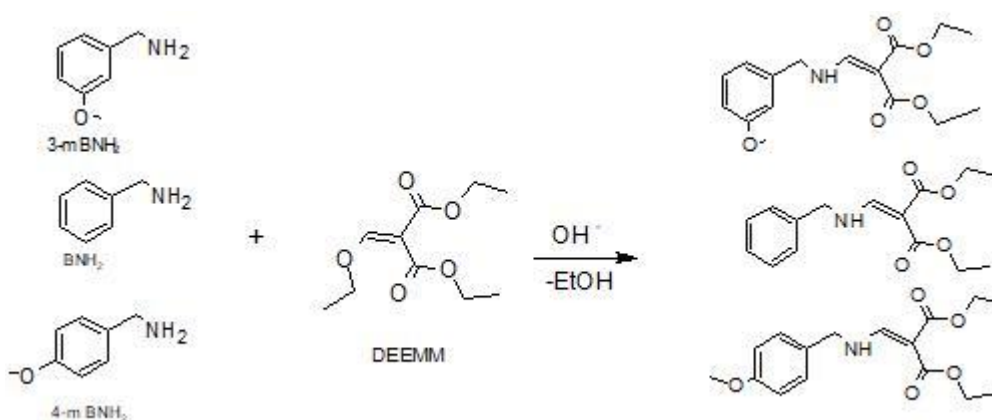


Figura 5: Esquema de la reacción de derivatización con DEEMM

En un tubo Safe-Lock Eppendorf, se pipeteó 50 uL del extracto de maca general (para determinar la recuperación se agregó 10 uL de estándar equivalente a 100 ug/mL de BNH₂, 4 metoxi-BNH₂ y 3 metoxi-BNH₂). Se diluye con 85 uL de agua. Se agregó 170 uL Buffer Borato 1M 9.0, 40 uL MeOH y 3 uL de DEEMM. Se sonicó por 30 minutos a 30°C. Se dejó reaccionar por 2 horas a 70°C en un bloque termostatzado para eliminar el resto de reactivo DEEMM libre. La muestra derivatizada se centrifugó y se colocó en un inserto, y se inyectó dentro de las 8 horas posteriores a su derivatización. Se inyectó 1 uL según las condiciones cromatográficas especificadas en la sección 5.2.13.3

5.2.13. Condiciones cromatográficas.

5.2.13.1. Macamidas y ácidos grasos libres.

Fase estacionaria	Columna LiChrospher 100 RP-18, 250mm x 4mm (5µm)																																
Fase móvil	ACN (A): AGUA (B): METANOL(C), los solventes están acidificados con 0.005%TFA.																																
Modo de elución	Gradiente																																
	<table><thead><tr><th>t</th><th>A</th><th>B</th><th>C</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>33.00</td><td>65.00</td><td>2.00</td></tr><tr><td>4.00</td><td>33.00</td><td>65.00</td><td>2.00</td></tr><tr><td>6.00</td><td>14.00</td><td>85.00</td><td>1.00</td></tr><tr><td>26.00</td><td>0.00</td><td>100.00</td><td>0.00</td></tr><tr><td>35.00</td><td>0.00</td><td>100.00</td><td>0.00</td></tr><tr><td>40.00</td><td>33.00</td><td>65.00</td><td>2.00</td></tr><tr><td>45.00</td><td>33.00</td><td>65.00</td><td>2.00</td></tr></tbody></table>	t	A	B	C	0.00	33.00	65.00	2.00	4.00	33.00	65.00	2.00	6.00	14.00	85.00	1.00	26.00	0.00	100.00	0.00	35.00	0.00	100.00	0.00	40.00	33.00	65.00	2.00	45.00	33.00	65.00	2.00
t	A	B	C																														
0.00	33.00	65.00	2.00																														
4.00	33.00	65.00	2.00																														
6.00	14.00	85.00	1.00																														
26.00	0.00	100.00	0.00																														
35.00	0.00	100.00	0.00																														
40.00	33.00	65.00	2.00																														
45.00	33.00	65.00	2.00																														
Temperatura del horno	40°C																																
Flujo	1mL/min																																
Volumen de inyección	20uL																																
Detección	210nm, UV-DAD																																
Equipo	HPLC Agilent 1260 con horno termostatzado para columnas, inyector automático y detector de arreglo de diodos.																																

5.2.13.2. Ácidos grasos totales, libres y oxidados.

Fase estacionaria	Columna DB-5 ms (30 m x 0.25 mm, 0.25 um de grosor de capa)
Fase móvil	Gas Helio
Temperatura del inyector	280°C
Ionización	70eV
Temperatura del horno	Programa de temperatura

Ratio	Temperatura	Retención
	55°C	2 min
20°C	185°C	3 min
7.5°C	230°C	1 min
10°C	310°C	8 min

Flujo de Helio	0.9 mL/min inicial (2min) hasta 1.4mL /min a un ratio de 0.4mL/min.
Volúmen de inyección	1uL
Split	1/20
Equipo	Cromatógrafo de gases Agilent 7890 GC acoplado a un detector de masas 5977 cuadrupolo MSD.

5.2.13.3. Bencilamina.

Fase estacionaria	Columna de HPLC, ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1x50mm 1.8 um.																																								
Fase móvil	Buffer acetato 25 mM pH 6.5 (A): ACN (B): Agua(C).																																								
Modo de elución	Gradiente																																								
	<table><thead><tr><th>t</th><th>A</th><th>B</th><th>C</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>70.00</td><td>30.00</td><td>00.00</td></tr><tr><td>1.00</td><td>70.00</td><td>30.00</td><td>00.00</td></tr><tr><td>2.50</td><td>40.00</td><td>60.00</td><td>00.00</td></tr><tr><td>5.00</td><td>20.00</td><td>80.00</td><td>00.00</td></tr><tr><td>5.50</td><td>0.00</td><td>80.00</td><td>20.00</td></tr><tr><td>7.50</td><td>0.00</td><td>80.00</td><td>20.00</td></tr><tr><td>8.00</td><td>50.00</td><td>50.00</td><td>00.00</td></tr><tr><td>9.00</td><td>70.00</td><td>30.00</td><td>00.00</td></tr><tr><td>15.00</td><td>70.00</td><td>30.00</td><td>0.00</td></tr></tbody></table>	t	A	B	C	0.00	70.00	30.00	00.00	1.00	70.00	30.00	00.00	2.50	40.00	60.00	00.00	5.00	20.00	80.00	00.00	5.50	0.00	80.00	20.00	7.50	0.00	80.00	20.00	8.00	50.00	50.00	00.00	9.00	70.00	30.00	00.00	15.00	70.00	30.00	0.00
t	A	B	C																																						
0.00	70.00	30.00	00.00																																						
1.00	70.00	30.00	00.00																																						
2.50	40.00	60.00	00.00																																						
5.00	20.00	80.00	00.00																																						
5.50	0.00	80.00	20.00																																						
7.50	0.00	80.00	20.00																																						
8.00	50.00	50.00	00.00																																						
9.00	70.00	30.00	00.00																																						
15.00	70.00	30.00	0.00																																						
Temperatura del horno	40°C																																								
Flujo	0.4 mL/min																																								
Volúmen de inyección	1uL																																								
Detección	280nm, UV-DAD																																								
Equipo	HPLC Agilent 1200 con horno termostatzado para columnas, inyector automático y detector de arreglo de diodos.																																								

6. Resultados

Las pruebas iniciales trataron de determinar las condiciones más favorables (entiéndase favorables como: mayor cantidad de amidas producidas y un tiempo de secado prolongado). El tipo de procesamiento (maca rallada o maca en rodajas) influye en el tiempo de secado. La Figura 6 muestra la cinética de humedad de maca rallada y maca en rodajas a 30°C y 40°C. La maca en rodajas seca más rápido que la maca rallada, independientemente de la temperatura para la estandarización de los parámetros de procesamiento de tejidos, tipo de secado y temperatura que lleven a

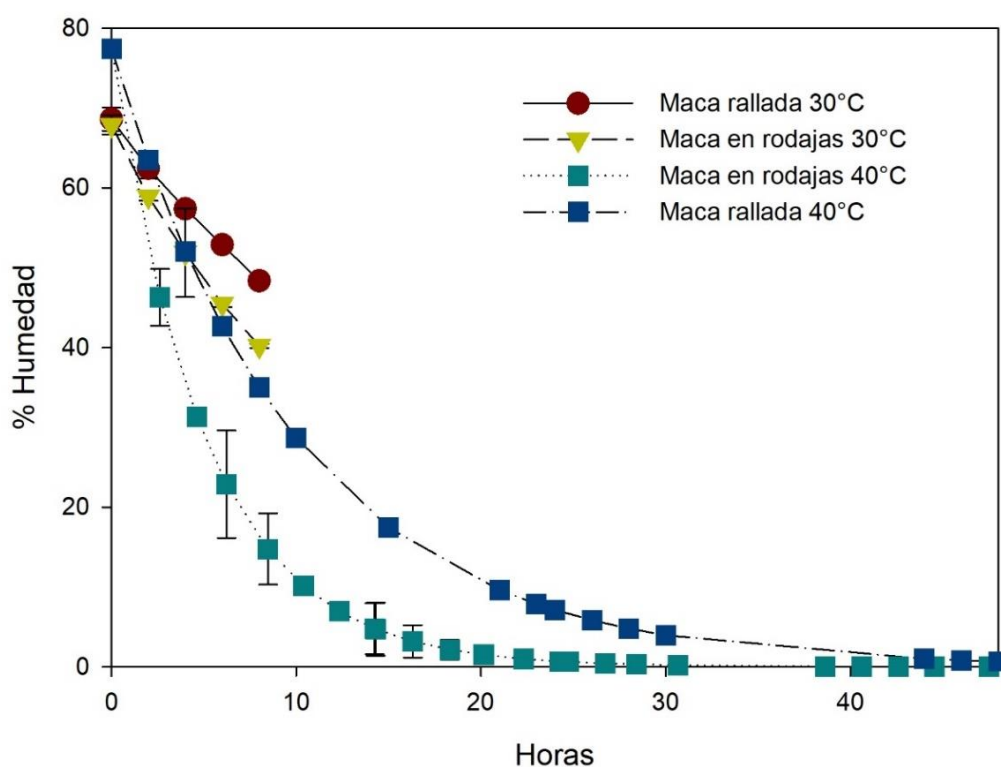


Figura 6: Secado de maca a diferentes temperaturas

un máximo rendimiento de amidas bioactivas.

La velocidad de secado (Disminución del %Humedad en el tiempo) de maca en rodajas es mayor a la de maca rallada, bajo las condiciones establecidas. En las cinéticas a 40°C se controló la cantidad de metabolitos producidos.

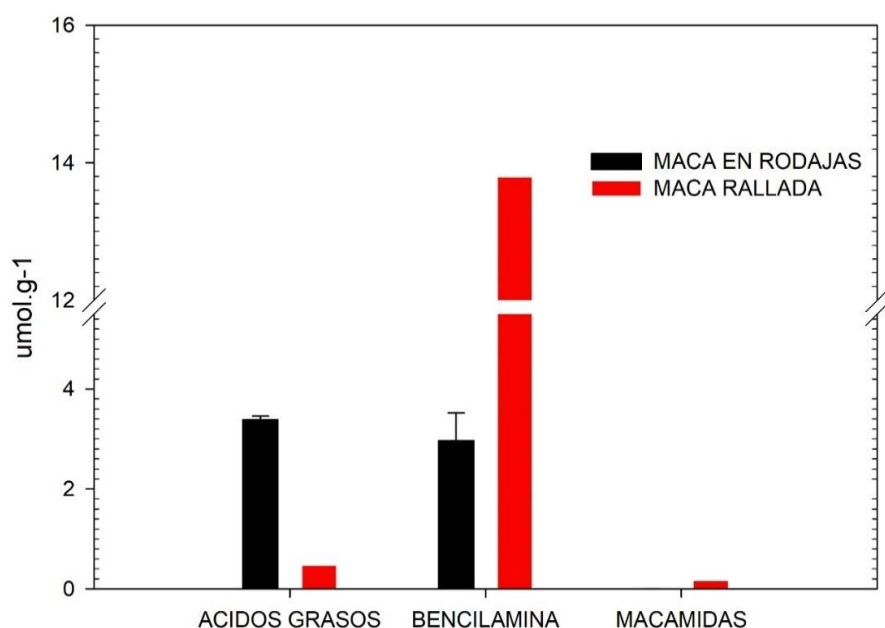


Figura 7: Efecto del procesamiento de maca rallada y en rodajas.

En la Figura 7 se muestra los valores de los metabolitos (ácidos grasos, bencilamina y macamidas) determinados a las 24 horas de la cinética a 40°C. Los niveles de acumulación de bencilamina en maca rallada a las 24 horas son mayores a las de maca en rodajas (4 veces mayor). No se detectó formación de macamidas en maca en rodajas a las 24 horas. Los mismos valores se pueden ver en detalle en la Tabla 7.

Tabla 7: Efectos del procesamiento a las 24 horas.

	Maca rallada	Maca en rodajas	Error
	umol.g-1		
Ácidos grasos	0.4717	3.3852	0.0722
Bencilamina	13.796	2.9605	0.56
Macamidas	0.1706	ND	6.10E-03

El tiempo de preparación de las muestras en rodajas es superior a la de maca rallada. Procesar maca como rodajas no incorpora todo el tejido, sólo el tejido central del hipocotilo. Por limitaciones físicas producir maca en rodajas necesita de hipocotilos más uniformes con un rango de pesos más estrecho (10 g). Rallar la maca permite la incorporación total de tejido y muestras más heterogéneas, se empleó muestras de tamaños en rangos más amplios (20 g). El empleo de desecante permitirá observar cambios dependientes de la humedad que de la temperatura. Finalmente, en la Tabla 8

se resumen los parámetros de secado de maca que se emplearon para la evaluación de los metabolitos objetivo.

Tabla 8: Parámetros de secado empleados

	TIPO DE SECADO	
	Con desecante	Sin desecante
Forma de procesamiento	Maca rallada	
Temperaturas	25°C, 30°C, 40°C	
Flujo de aire		
Tiempo de secado	48 horas	
Tamaño de hipocotilos	25 -50 g de peso	

De los experimentos realizados, la Tabla 9 contiene un resumen de los parámetros de ajuste a una curva exponencial decreciente con SigmaPlot®11; las mismas curvas son graficadas en la Figura 8 (siguiente página). A partir del parámetro b se calcula la tasa de decaimiento porcentual que explica la tasa de secado (pérdida de humedad) de las cinéticas.

Tabla 9: Parámetros de ajuste de las curvas de secado

**Ajuste de decaimiento exponencial $f = a \cdot \exp(-b \cdot x)$, 2 parámetros; ajuste $R^2: 0.9629$
Error Std.(Error estándar): 5.0006 ; a = 74.2280.**

Secado con desecante

Temperatura	b	Error Std.	Tasa de decaimiento ²	Nivel de confianza		Observaciones
				Límite inferior	Límite superior	
25°C	0.0223	0.0015	2.205	1.905	2.505	*
30°C	0.0279	0.0020	2.751	2.351	3.151	*
40°C	0.0564	0.0037	5.484	4.744	6.224	

Secado sin desecante

Temperatura	b	Error Std.	Tasa de decaimiento	Nivel de confianza		Observaciones
				Límite inferior	Límite superior	
25°C	0.0795	0.0057	7.642	7.136	8.148	+
30°C	0.0928	0.0070	8.862	8.224	9.500	+
40°C	0.1330	0.0121	12.453	11.177	13.729	

Para * y +, las tasas no son estadísticamente diferentes. Nivel de confianza calculado como: $\pm 1.96 \cdot \text{Error Std.}$

² La tasa de decaimiento se expresan en %humedad.hora-1

De la Tabla 9, las tasas de decaimiento porcentual fueron calculadas a partir de la aproximación de la curva exponencial decreciente, al comparar las tasas de decaimiento de los primeros tres experimentos 25°C /SD, 30°C /SD, 40°C /SD (sin desecante) los dos primeros son estadísticamente diferentes de la tasa obtenida a 40°C /SD. Sólo las

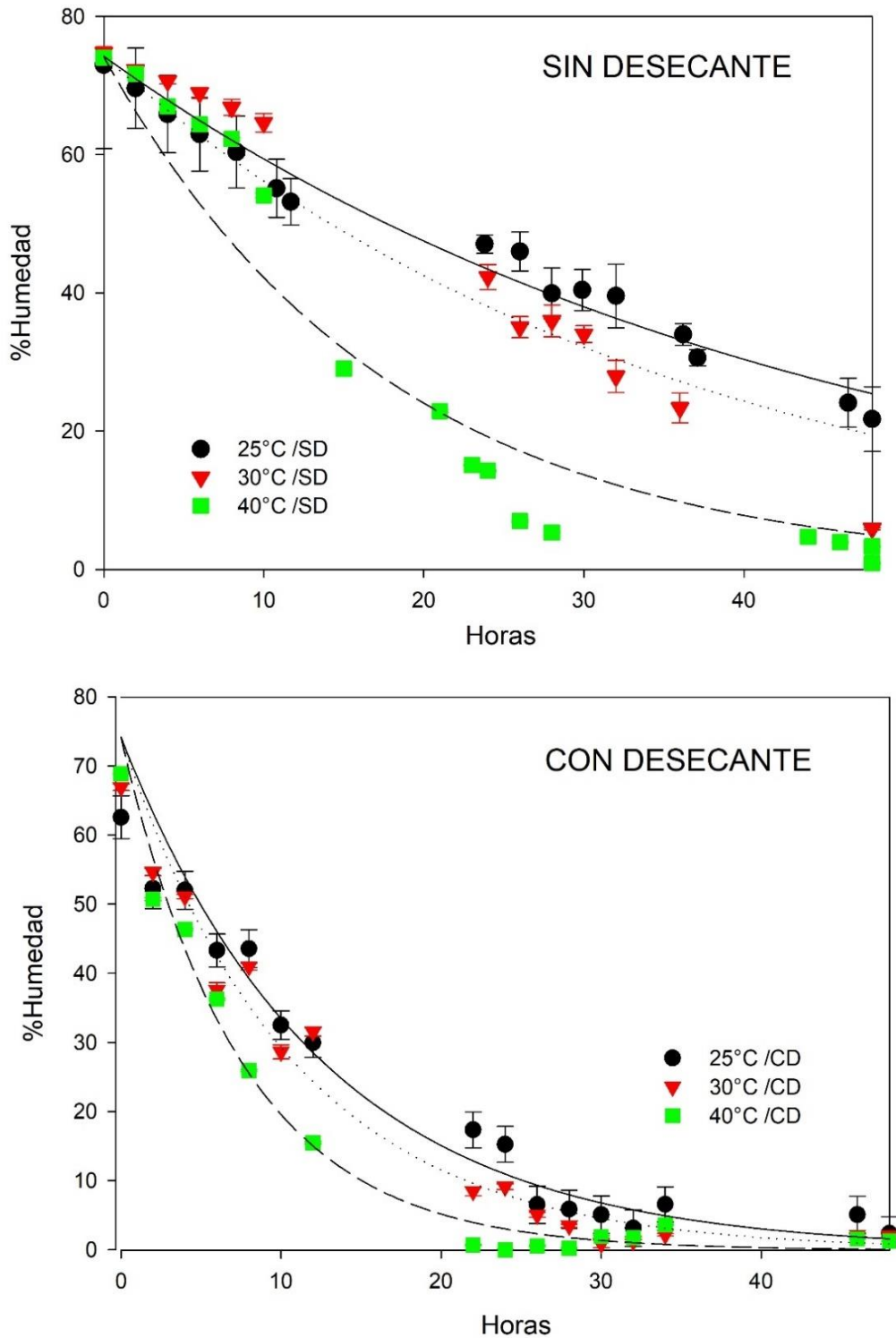


Figura 8: Cinética del porcentaje de humedad de los experimentos de secado.

cinéticas 25°C /SD, 30°C /SD tienen una humedad residual mayor a 20% al final del control. Muy por encima del típico 5% de los otros 5 experimentos.

En las cinéticas con desecante (25°C /CD, 30°C /CD, 40°C /CD) el factor humedad no debería ser importante porque las tasas de pérdida de humedad en las tres temperaturas no son estadísticamente diferentes.

La Figura 9 resume los valores de los analitos monitoreados controlados al final de cada uno de los experimentos tal como se detalla en los apartados de muestreo (en 5.2.1.1) y extracción (según 5.2.6 y 5.2.7), los porcentajes de recuperación se pueden observar en el Anexo 3.

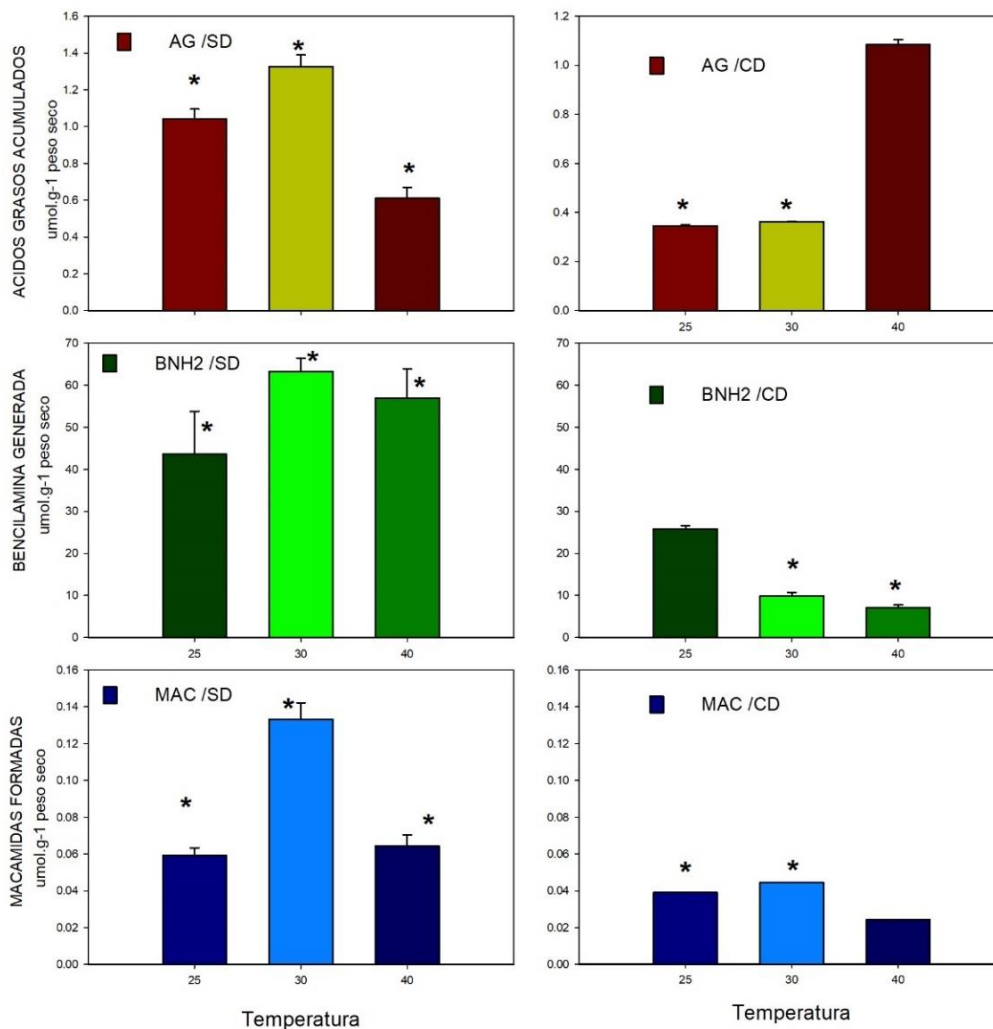


Figura 9: Metabolitos totales acumulados al final de los experimentos de secado.

Para las cuantificaciones se realizaron calibraciones con estándares del laboratorio (ver Anexo 6). El contenido de macamidas es favorecido a menor temperatura. En relación molar, los ácidos grasos son diez veces más abundantes que las macamidas y la bencilamina es 20 veces más abundante. Para cada grupo de experimentos de secado los valores de ácidos grasos, bencilamina y macamidas acumulados a diferentes temperaturas señalados con (*) no son estadísticamente diferentes (ver Anexo 5).

La Figura 10 muestra en detalle las curvas de ajuste exponencial de las cinéticas de liberación de ácidos grasos (C18:2 y C18:3) en los experimentos de secado con desecante (CD) y sin desecante (SD).

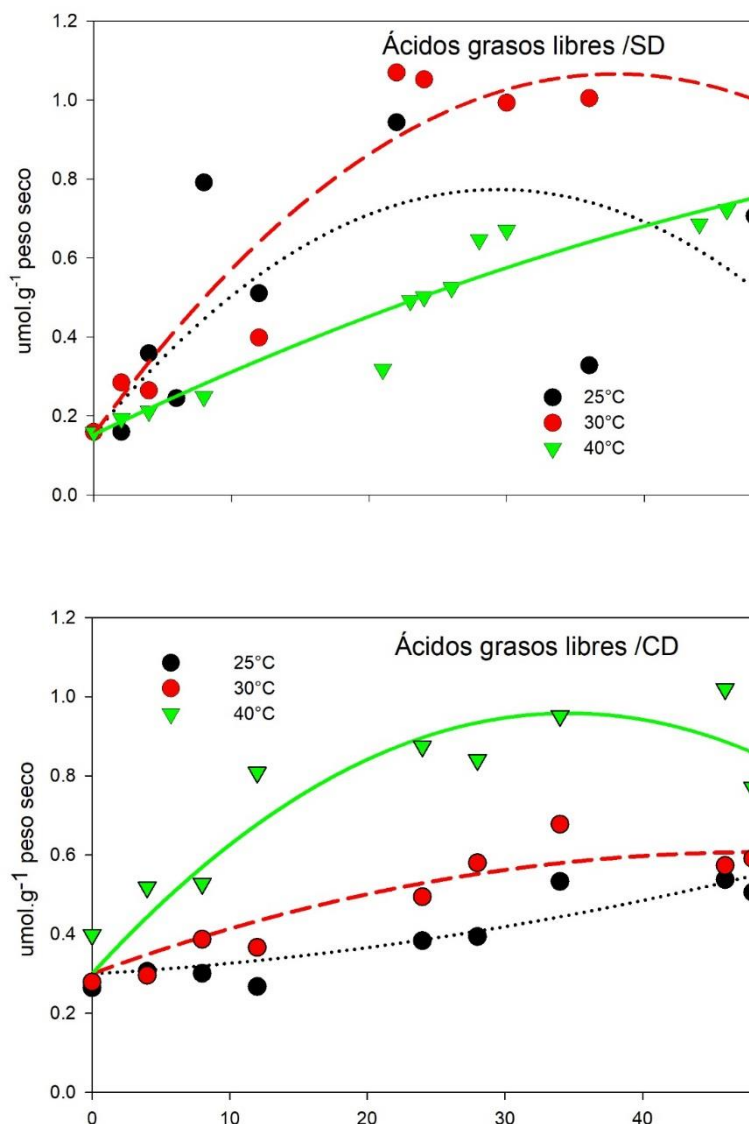


Figura 10: Liberación de ácidos grasos de los experimentos de secado

En la parte superior de la Figura 10 (Ácidos grasos libres/SD) los puntos de datos están muy dispersos y las curvas alcanzan un ajuste de correlación bajo, sobre todo para las cinéticas de 25°C/ SD y 30°C/ SD. La cinética con un mayor comportamiento uniforme es la de 40°C/ SD, como los comportamientos de los experimentos con desecante. Sólo los experimentos de secado con una tasa de decaimiento superior al 4.7% muestran comportamientos con un mejor ajuste exponencial. La máxima liberación de ácidos grasos en ambos casos es menor a 1,2 μ M.

En el seguimiento de 48 horas de los experimentos, no se determinó la presencia de otros ácidos grasos liberados por GC/MS (sección 5.2.7, 5.2.11 y 5.2.13.2) diferentes de los ácidos grasos C16:0, C18:(0,1,2,3) durante la cinética de 48 horas. Al emplear una hidrólisis ácida en las muestras (sección 5.2.10, 5.2.11 y 5.2.13.2) se determinó la presencia de otros ácidos grasos (C14:0, C19:0, C24:0) en maca que no se liberan en el periodo de tiempo evaluado.



La generación de bencilamina (ver Figura 11) es evidentemente mucho mayor y más dispersa en los experimentos en los que no se empleó desecante. La evolución de las cinéticas con desecante en bencilamina a 30°C y 40°C grados no muestran una diferencia significativa. Existe una gran diferencia entre los datos reportados en 25°C y los grupos 30°C y 40°C. Los mayores ratios molares se encuentran relacionados a la temperatura a 25°C. La data a 25°C es la que más dispersa se encuentra.

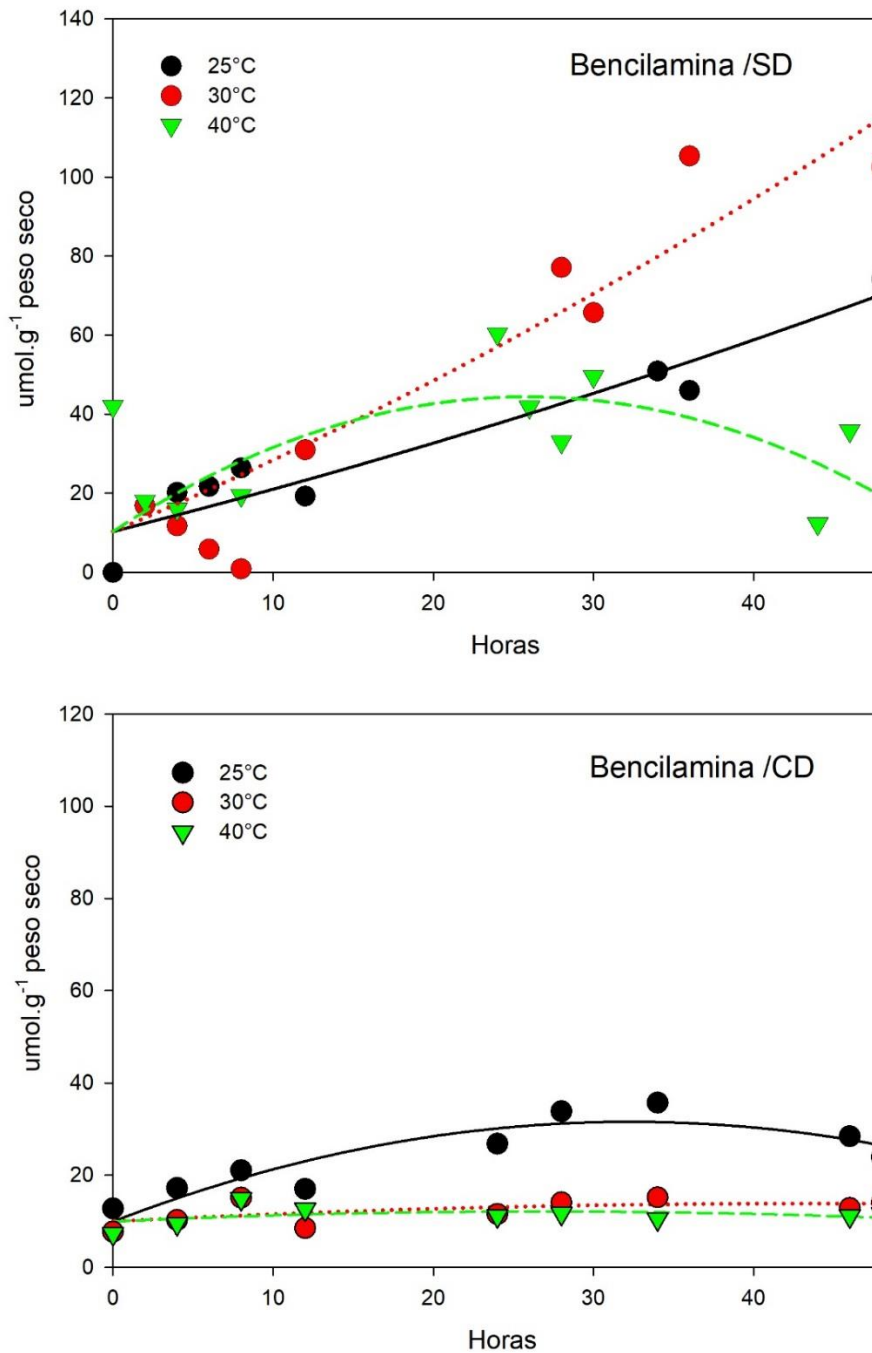


Figura 11: Generación de bencilamina en los experimentos de secado

Para evaluar las relaciones molares de ácidos grasos libres a bencilamina y su relación con la tasa de formación de macamidas (curvas de formación de macamidas en Anexo 4), en la Tabla 10 se muestran las matrices de correlación entre las tasas de formación de macamidas ($\text{umol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) y los ratios molares BNH_2/AG (Bencilamina/ácidos grasos, $\text{umol.g}^{-1} / \text{umol.g}^{-1}$).

De la Tabla 10, el par de variables con coeficientes de correlación positivos y valores de P inferiores a 0.050 tienden a aumentar en conjunto. Para los pares con coeficientes de correlación negativos y valores de P por debajo de 0.050, una variable tiende a disminuir mientras que la otra aumenta. Para pares con valores de P mayores que 0.050, no hay una relación significativa entre las dos variables.

No se evidencia correlación entre la tasa de producción de macamidas y los ratios molares BNH_2/AG .

Tabla 10: Matriz de correlación entre el ratio molar (BNH_2/AG) y tasa de formación de macamidas

	Tasa 25°C/SD	Tasa 30°C/SD	Tasa 40°C/SD	Tasa 25°C/CD	Tasa 30°C/CD	Tasa 40°C/CD
Ratio molar 25°C/SD	0.579 0.173 7					
Ratio Molar 30°C/SD		-0.592 0.161 7				
Ratio molar 40°C/SD			-0.542 0.132 9			
Ratio Molar 25°C/CD				0.238 0.538 9		
Ratio Molar 30°C/CD					-0.582 0.0999 9	
Ratio Molar 40°C/CD						-0.65 0.0581 9

Contenido de celdas (de arriba a abajo): Coeficiente de correlación, valor P y número de muestras.

Para la caracterización preliminar de los ácidos grasos oxidados producidos en el secado, por cromatografía de capa fina se separó (según 5.2.9) los compuestos de interés del extracto lipídico (según 5.2.8). Los cromatogramas se pueden ver en el Anexo 2. En la Tabla 11 se resume los resultados del análisis del extracto lipídico de maca, la mayor parte de los constituyentes están en la zona de los carotenos.

Tabla 11: Composición de fracción lipídica

Zona	% Área	Clase de lípidos	Estándar	Observaciones*		
				Yodo	256nm	360nm
1	9.06 ± 4.69	Lípidos volátiles	BCN, BITC	x	x	x
2	7.13 ± 8.22	Macamidas	Macamidas 16, 18-2, 18-3	x	x	
3	12.36 ± 6.50	Ácidos grasos	C16:0, C18:2, C18:3, C18	x	x	
4	7.32 ± 4.45	Triglicéridos	Trioleína	x	x	
5	11.91 ± 4.65	Lípidos N/D	N/D	x		
6	3.16 ± 10.57	Lípidos N/D	N/D	X	x	
7	49.06 ± 4.04	Lípidos -Carotenoides (8.30 ± 1.97 %)	-Carotenos	x	x	x

*Se marca el método de visualización de los metabolitos, N/D: No determinado

De la Tabla 11, la clase de lípidos es atribuida de acuerdo el Rf de los estándares (según 5.2.9). Los ácidos grasos encontrados representan el 0.035% ^a de maca en matrices muy oxidadas.

Los ácidos grasos disponibles representan apenas el ≈10% del total de la fracción lipídica, alrededor del 0.1% del peso total de maca seca (lípidos totales ≈1% como figuran en el Anexo 1).

De la Zona 3, atribuida a los ácidos grasos de acuerdo al Rf del estándar, se separó el grupo de ácidos grasos oxidados - separación y caracterización por HPLC/UV (sección 5.2.13.1)- que se muestran en la Figura 12 (siguiente página). Se detectaron 4 sustancias. Las sustancias se distinguieron de otras por su absorción a 230 nm ya que los dienos conjugados de hidroperóxidos producidos a partir de lípidos poliinsaturados

^a Porcentaje estimado del cromatograma de HPLC/UV, el porcentaje se calculó asumiendo un coeficiente de extinción similar al de sus ácidos grasos putativos (ácido linoleico).

tienen una fuerte absorción a 230 - 235nm (Dobarganes y Velasco, 2002; Frankel, 2014).

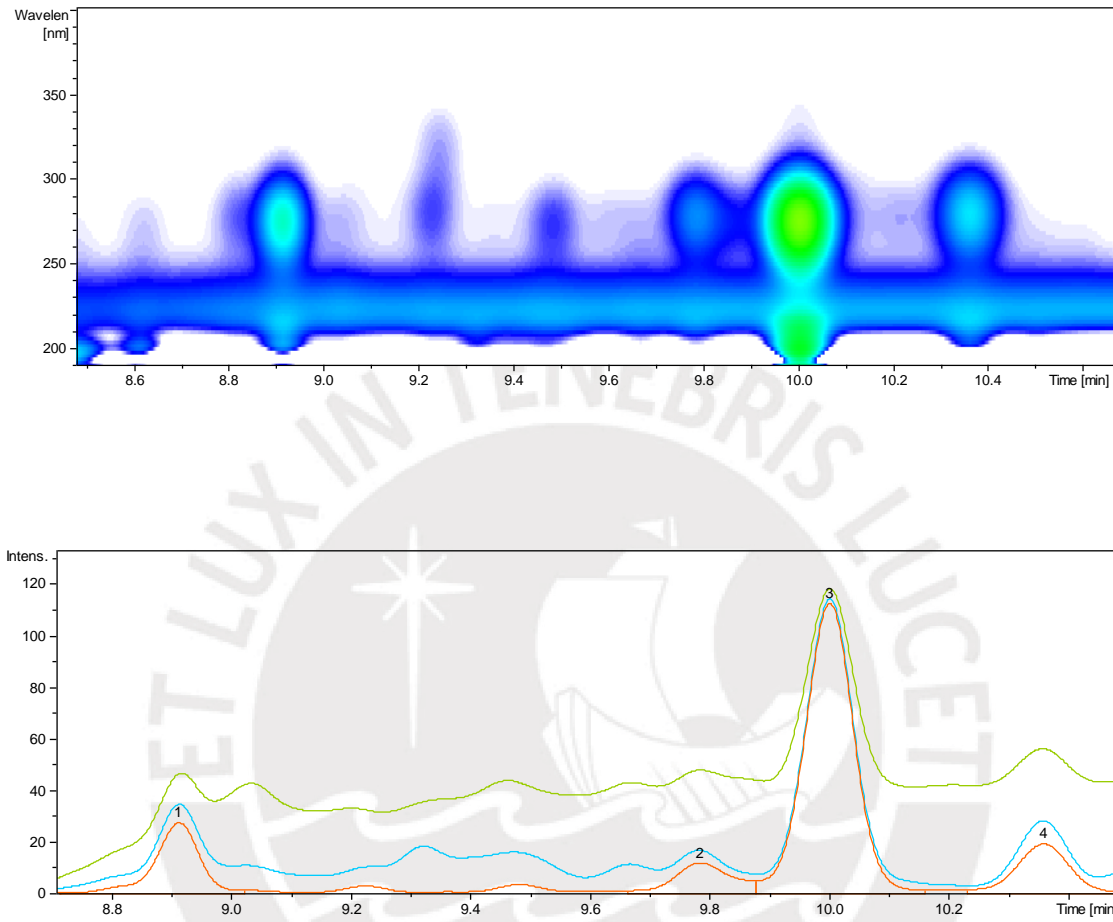


Figura 12: Caracterización UV de los ácidos grasos oxidados en la fracción lipídica de la maca.

Arriba se muestra el mapa de densidad de absorción ultravioleta de los ácidos grasos separados. Abajo se muestran los picos y los cromatogramas de absorción a 210nm (azul), 230nm(verde) y 280nm (naranja).

La misma fracción de ácidos grasos fue derivatizada según el método de derivatización de ácidos grasos (en 5.2.11) y detectada por GC/MS (según 5.2.13.2). El cromatograma, los espectros de masas y esquema en detalle de las fragmentaciones –del espectro de masas- puede observarse en el Anexo 8. La información obtenida de los espectros de masas no son suficiente información para justificar la separación de cada pico eluido por HPLC/UV.

La Figura 13 (siguiente página) muestra las estructuras propuestas para los ácidos grasos oxidados detectados por GC/MS. Por las fragmentaciones, de los espectros se

puede afirmar que existen por lo menos 2 insaturaciones entre los carbonos 8 y 12 de los ácidos grasos oxidados, además, todos los ácidos grasos producidos poseen radicales oxo- o hidroxilo- en el carbono 12.

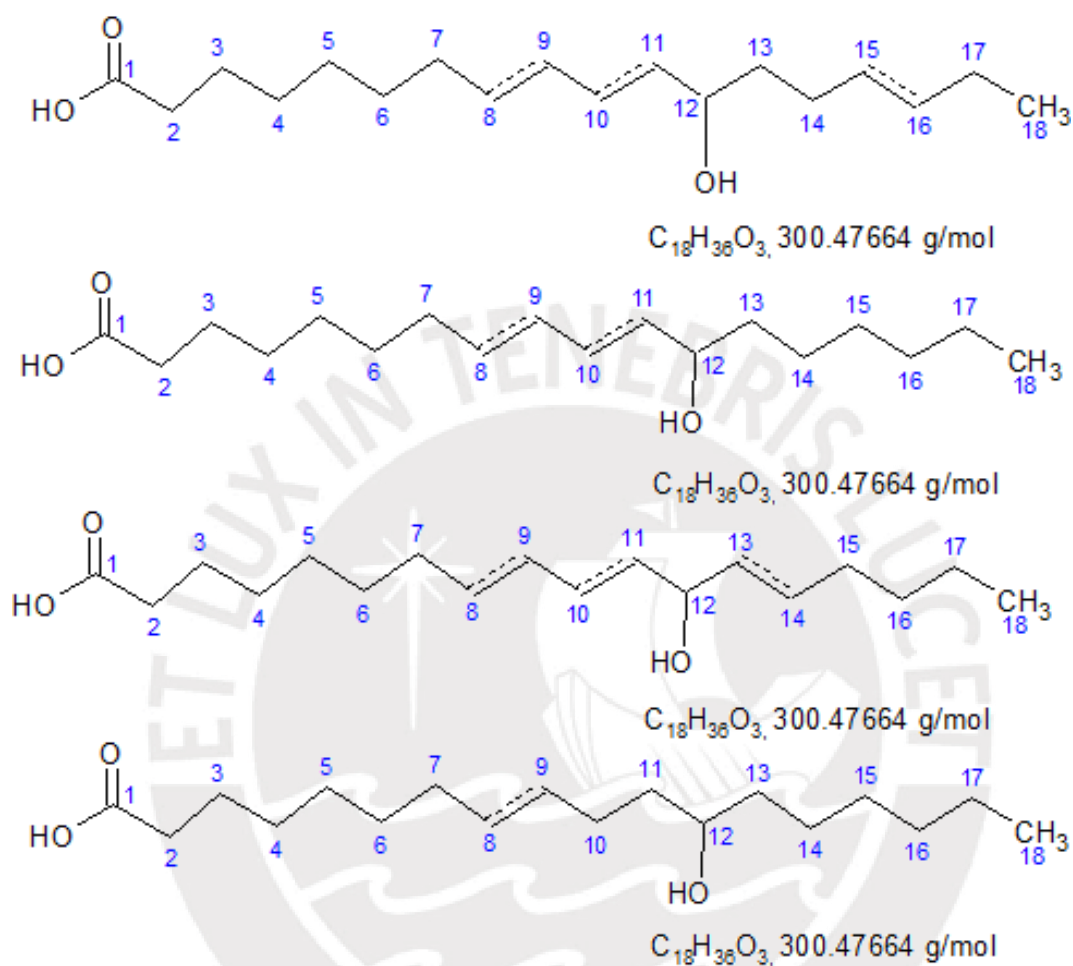


Figura 13: Ácidos grasos oxidados detectados en la fracción lipídica de la maca.

Para determinar el origen de los ácidos grasos oxidados se evaluó la correlación entre los ácidos grasos oxidados acumulados y los ácidos grasos libres correspondientes monitoreados en el experimento 25°C/CD.

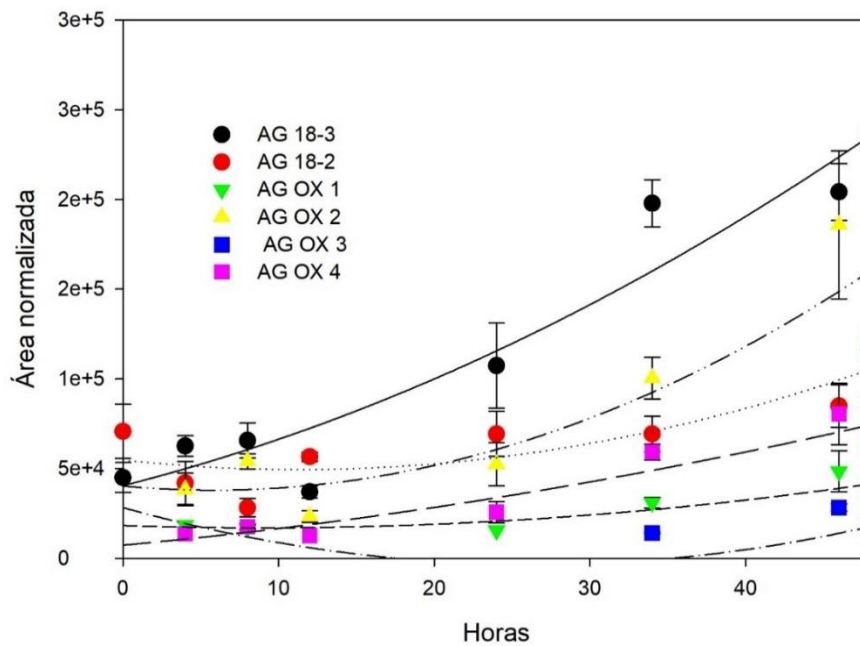


Figura 14: Ácidos grasos oxidados en la cinética de 25°C /CD

La Figura 15 muestra el comportamiento de los ácidos grasos liberados y los oxidados en 48 horas a 25°C/CD, sólo la formación de ácidos grasos oxidados (AG OX 2 y AG OX 4) muestra una correlación con la liberación de ácido graso linolénico (Tabla 12).

Tabla 12: Matriz de correlación ácidos grasos y sus derivados oxidados en la cinética 25°C

	AG 18-2	AG OX 1	AG OX 2	AG OX 3	AG OX 4
AG 18-3	0.765	0.43	0.902	0.616	0.896
	0.0271	0.395	0.00553	0.577	0.00632
	8	6	7	3	7
AG 18-2		0.616	0.627	-0.463	0.665
		0.193	0.132	0.694	0.103
		6	7	3	7

De la Tabla 12, El par de variables con coeficientes de correlación positivos y valores de P inferiores a 0.050 tienden a aumentar en conjunto. Para los pares con coeficientes de correlación negativos y valores de P por debajo de 0.050, una variable tiende a disminuir mientras que la otra aumenta. Para pares con valores de P mayores que 0.050, no hay una relación significativa entre las dos variables.

Los ácidos grasos oxidados fueron monitoreados tanto por HPLC/UV (junto a los ácidos grasos liberados en 25°C/SD, 30°C/SD, 40°C/SD, 25°C/CD, 30°C/CD y 40°C/CD) como por GC/MS (sección 5.2.7, 5.2.11 y 5.2.13.2) en los experimentos (secados a 25°C/SD, 30°C/SD y 40°C/SD).

La Figura 14 muestra el porcentaje de oxidación de los ácidos grasos producidos en los experimentos de secado, descritos de acuerdo a la temperatura y tasa de secado (de la tasa de decaimiento en la tabla 9) de cada experimento. El porcentaje de oxidación explica el porcentaje de ácidos grasos oxidados respecto de los ácidos grasos al final de cada cinética. Se cuantificó los ácidos grasos liberados, basándose en el área normalizada de los cromatogramas de ácidos grasos utilizando HPLC/UV.

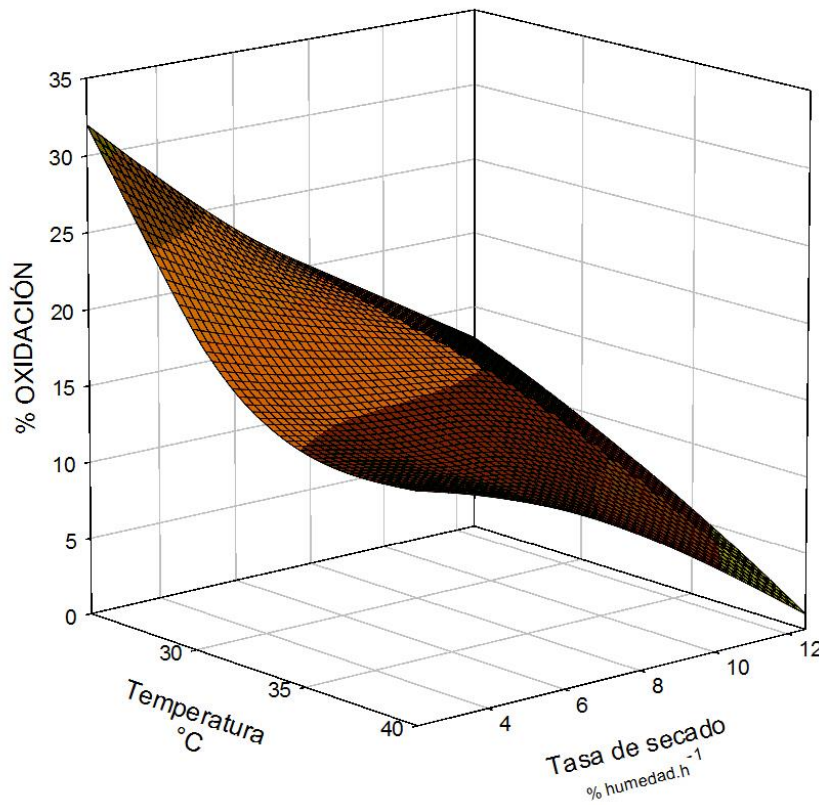


Figura 15: Porcentaje de oxidación de ácidos grasos relacionado a la temperatura y tasa de secado.

De la figura 14, Independientemente de la cantidad de ácido graso liberado, la menor temperatura y mayor humedad disponible (tasa de secado baja) favorecen la formación de productos oxidados de ácidos grasos en maca.

7. Discusión de resultados

Los hipocotilos empleados (maca de variedad amarilla) fueron adquiridos comercialmente. Como no se han observado diferencias concluyentes en los niveles de metabolitos monitoreados asociados a diferentes orígenes, condiciones de cultivo o fenotipos de maca (Zhao et al., 2012; Meissner et al., 2015), los resultados del estudio pueden considerarse reproducibles en otras variedades de maca.

Se requirió del desarrollo de un protocolo de secado para producir resultados reproducibles disminuyendo la varianza y mostrar una distribución normal de datos, sin embargo la forma de muestreo (las muestras se juntan y muelen, antes de su extracción por triplicado) no mide las posibles variaciones que otros factores en el horno (flujo de aire, transferencia de calor, etc.) pueden causar en el secado.

El secado de maca en horno ha probado producir acumulación de macamidas de la misma forma que el secado tradicional (Esparza et al., 2015). Se ha evaluado el efecto del procesamiento sobre maca (rallada y en rodajas), aunque se ha reportado que el daño tisular está asociado a la degradación de glucosinolatos (medido en el estudio por la generación de bencilamina), la ausencia de macamidas detectables a las 24 horas en maca en rodajas y una formación de bencilamina más lenta, no se descarta este tipo de procesamiento para otros estudios experimentales.

Las tasas de secado de los experimentos de 25°C/SD y 30°C/SD no son estadísticamente diferentes, lo cual quiere decir que la disminución de humedad por el efecto de la temperatura fue la misma. La cinética de 40°C/SD, por el contrario, exhibe un comportamiento de crecimiento mucho más bajo similar a las cinéticas de 25°C 30°C y 40°C con desecante.

Tanto para el monitoreo de ácidos grasos libres, como bencilamina y macamidas, se optimizó el método de extracción general empleado tradicionalmente (Esparza et al. 2015), la forma de muestreo permitió la reducción del tamaño de muestra, reduciendo la cantidad de solvente y tiempo empleado sin afectar la recuperación de extracción reportadas para el método (Hadzich, 2016). Se logró un método de extracción más rápido.

De la evaluación de los efectos de la temperatura de secado sobre el catabolismo de lípidos se observó que las temperatura evaluadas no tienen efectos distintivos sobre la liberación de ácidos grasos y se encontraron mayores diferencias de contenido de ácidos grasos liberados a más bajas velocidades de secado (mayor humedad

disponible), un claro indicador de que existen enzimas involucradas en el catabolismo de lípidos. En muchos organismos los ácidos grasos se liberan debido a lipasas, enzimas que actúan por acción de la humedad y la temperatura. Se puede esperar que favorecidas por una tasa de velocidad de secado menor, es decir humedad que se conserva por más tiempo, las enzimas produzcan una mayor liberación de ácidos grasos.

La evaluación de las relaciones molares de ácidos grasos a bencilamina y su relación con la tasa de formación de macamidas requirió del monitoreo de los metabolitos en las cinéticas realizadas. Para ello se trabajó en la cuantificación de bencilamina empleando derivatización DEEMM; observando derivados con más tiempo de estabilidad (mayor a 60 horas) lo cual facilitó su detección en comparación con métodos clásicos como el de derivatización con OPA (o-ftalaldehído), sin embargo el método de detección UV no distingue entre bencilamina, 4-metoxi bencilamina y 3-metoxi bencilamina derivatizadas por lo que los niveles de bencilamina reportados incluyen estos tres metabolitos; el método no permite futuros estudios entre de relación entre bencilamina y glucosinolato de origen. El proceso de extracción para su cuantificación necesita ser optimizado, se requiere de un procedimiento de concentración y eliminación de otros compuestos extraídos que podrían saturar la columna (azúcares, proteínas, etc.), ya que durante la detección cromatográfica de los derivados se observó variaciones de presión que hicieron necesarios exhaustivos lavados de columna para mantener la idoneidad de sistema.

Las cinéticas muestran que la formación de bencilamina es dependiente en primera instancia de la humedad y después de la temperatura, para un mismo tipo de procesamiento de maca (rallado). A 25°C y alta humedad disponible en la matriz (posible por la baja tasa de velocidad de secado) la formación de bencilamina es alta, como se ha observado antes, las temperaturas altas no son favorables para la formación de bencilamina (Chen et al., 2017).

Las diferentes cantidades de bencilamina generadas en los experimentos no muestran diferencias estadísticas en la eficiencia de secado (cantidad de macamida producida).

Los valores de ácidos grasos y bencilamina son evidentemente mayores en las cinéticas sin desecante, sin embargo los experimentos en los que se empleó desecante producen contenidos finales de macamidas similares en ambos experimentos. En los experimentos con desecante el rendimiento de macamidas más alto es a 40°C, sin embargo esta cinética de 40°C es la que menos ácido graso disponible produjo. Una mayor liberación de ácidos grasos y de bencilamina no parece estar directamente

relacionada a la formación neta de macamidas lo que sugiere un papel enzimático determinante en la formación de macamidas bajo las condiciones de humedad y temperatura empleadas.

Aunque la disponibilidad de bencilamina es necesaria para la formación de macamidas (en el secado tradicional la formación de bencilamina es tan lenta que se detecta las macamidas luego de dos semanas de la cosecha), en los experimentos la generación lenta de bencilamina no condiciona la formación de macamidas cuando se ha superado las 12 horas. Se observó que la velocidad de secado puede tener efectos sobre la velocidad de formación de macamidas, sin embargo incluso con humedades del 5%, no se impide la formación de macamidas. Si la formación de macamidas es catalizada por enzimas éstas parecen actuar incluso bajo condiciones de baja humedad residual y en todos los rangos de temperaturas evaluados (25°C, 30°C y 40°C). Tal como observa Chen et al. (2017) la tasa de formación de macamidas es lenta a pesar de la disponibilidad de sus precursores, se observa también que los órdenes molares de formación de macamidas están muy por debajo de los productos de formación tal como Esparza et al. (2015), Hadzich (2016) y Chen et al. (2017) han reportado.

Aunque se buscó una correlación, se encontró que la relación molar entre bencilamina y ácidos grasos no está correlacionada a la tasa de formación de macamidas, como se sospecharía por las correlaciones reportados por Esparza et al. (2015). No es la primera vez que la formación de bencilamina en el secado tradicional no parece tener el mismo nivel de correlación que la formación de bencilamina en el secado artificial; en el estudio de Hadzich (Hadzich, 2016) se reporta coeficientes de correlación entre la bencilamina generada no relacionados a la cinética de formación de macamidas en secado artificial, a pesar de que se empleó otras condiciones experimentales (diferente temperatura, procesamiento de maca e intervalo de muestreo).

Para la caracterización preliminar de los ácidos grasos oxidados encontrados, se empleó cromatografía de capa fina para fraccionar un extracto clorofórmico de maca seca. Los resultados de la cromatografía realizada muestra cuan complejo es el extracto lipídico en concordancia a ello, un estudio realizado en 2017 con extracto clorofórmico reveló la presencia de alcaloides (6 mg ME/g), esteroides (45 mg/100g) y compuestos fenólicos (28 mg GAE/ g), también se estableció que la fracción clorofórmica es la más alta en actividad antioxidante (Gan et al., 2017). Existe un bajo porcentaje de lípidos neutros contenido en la parte lipídica de maca contrario a otros tejidos de almacenamiento como las semillas. En las cinéticas, no se ha determinado el origen de los ácidos grasos liberados, aunque por diversos estudios previos en otras especies y

la naturaleza del tejido se asume que se originan de acilglicéridos. Los resultados nos permiten predecir que futuros experimentos para modular la cantidad de macamidas producida a partir de los precursores en la planta; siendo exitosos apenas alcanzarían el 0.1% del peso total de maca seca.

De los ácidos grasos oxidados encontrados, sólo se emplearon las técnicas de HPLC/UV y GC/MS, por la cantidad de metabolitos aislados.

La caracterización de ácidos grasos oxidados por infrarrojo requiere de concentraciones poco económicas y sostenibles de obtener. Separar mayor cantidad de los ácidos grasos oxidados encontrados para su determinación y cuantificación no se encontró conveniente. En cuanto a un análisis de espectroscopia RMN, obtener un estándar puro apto para a partir de la fracción lipídica requiere para su separación alrededor de $\cong 28.5$ kg de muestra.

De las observaciones por GC/MS en la los ácidos grasos oxidados, se pudo identificar ácidos grasos oxidados sólo en el carbono 12. En sus investigaciones, Mlakar y Spiteller (1996) evalúan los patrones de oxidación de los ácidos grasos linoleico, linolénico y araquídico por procesos no enzimáticos y los comparan a patrones de oxidación enzimática ya estudiados.

Para el ácido linoleico las oxidaciones en los carbonos 9 y 13 son los más abundantes. De los productos provenientes de oxidaciones inducidas monoalílicamente los de las posiciones "exteriores" (en carbonos 8 y 14) son más abundantes que los de las posiciones 10 y 12 (como se ve en la Figura 16).

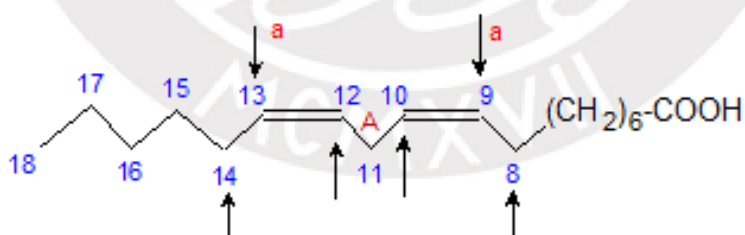


Figura 16: Sitios preferentes de remoción de hidrógeno en ácido linoleico

El grupo CH_2 doble alílicamente activado es indicado por A, los carbonos hidropoxidables correspondientes son indicados por la letra a, las posiciones monoalílicamente activadas son indicadas por sólo flechas. (Mlakar y Spiteller, 1996)

Para el ácido linolénico, en procesos no enzimáticos, los isómeros de las posiciones exteriores (en carbonos 9 y 16) predominan sobre las posiciones internas (en carbonos 12 y 13). Los principales productos (en carbonos 9 y 16), el grupo más remoto a grupo

carboxílico, es siempre obtenido en cantidades ligeramente mayores (como se ve en la Figura 17).

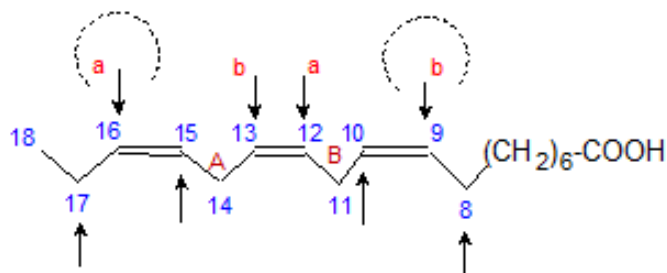


Figura 17: Sitios preferentes de remoción de hidrógeno en ácido linoléico

Los grupos CH₂ doble alílicamente activados son indicados por A y B, los carbonos hidroperoxidables correspondientes son indicados por la letra a y B, las posiciones monoalílicamente activadas son indicadas por sólo flechas. (Mlakar y Spiteller, 1996)

En la lipoperoxidación enzimática la oxidación es posible sólo en los sitios doble alílicamente activados en una reacción regioespecifica y estereoespecífica.

A pesar de que los estereoisómeros no pueden ser distinguidos por GC/MS, el patrón de ácidos grasos oxidados debería contener teóricamente un sólo pico de ser enzimático. Sin embargo la distinción en materiales biológicos es más complicada porque diferentes lipoxigenasas producen diferentes productos, que no son producidos en las mismas cantidades.

Existen otras enzimas oxidativas además de las lipoxigenasas, como el complejo citocromo P450. Sin embargo los patrones de oxidación que implican P450 muestran pares de derivados hidróxidos en parecidos cantidades en carbonos adyacentes (Ej.: 5,6-; 8, 9-; 11,12-). Lo que puede ayudar a distinguir fácilmente de otros patrones de oxidación por lipoxigenasa y procesos no enzimáticos.

En muchos casos una lipoperoxidación no enzimática está superpuesta en una enzimática. Una distinción posible en la mayoría de casos, se basa en la prevalencia de un solo producto en un proceso inducido por lipoxigenasas. Los derivados resultantes de oxidaciones en sitios monoalílicamente activados no pueden ser producidos por enzimas producidas por mamíferos, aunque los productos han sido detectados en cantidades minúsculas puede ser que en este caso una oxidación enzimática fue superpuesta por un proceso no enzimático (Mlakar y Spiteller, 1996).

Los patrones de oxidación en ácidos grasos sugieren procesos enzimáticos. La maca posee moléculas que son empleados con éxito como antioxidantes en otros alimentos (ácido ascórbico, tocoferol y compuestos fenólicos), los antioxidantes que se encuentran en maca parecen jugar un papel importante al impedir la auto oxidación (procesos no enzimáticos).

Los patrones de oxidación también sugieren que el ácido graso de origen es el linolénico, aunque por el análisis de correlación entre los ácidos grasos y sus derivados oxidados no existe suficiente evidencia para distinguir el ácido graso de origen.

No se ha detectado el ácido grasos oxidados en el carbono 5 que se ha reportado existen en maca (Muhammad et al., 2002).

La evaluación de la cinética de formación de ácidos grasos oxidados durante el secado requirió de un monitoreo cuidadoso tanto de los ácidos grasos como de sus derivados oxidados. Para ello se desarrolló una extracción de ácidos grasos modificada del método de Bligh-Dyer (Bligh y Dyer, 1959) que probó ser rápido, eficaz y tener una buena recuperación. Sin embargo, no se recomienda el almacenamiento prolongado de los extractos porque no se ha evaluado la estabilidad de los extractos a largo plazo y su extracción a pH ácido ($\text{pH} < 3$) empleando ácido tricloroacético podría generar otros derivados. La posterior derivatización con MSTFA, probó que no es factible para el monitoreo de otros metabolitos oxidados (macamidas oxidadas) que también son de interés.

En los experimentos observados, la cinética de oxidación de ácidos grasos es independiente de la formación de macamidas. Mientras que la formación de macamidas es lenta y constante incluso a temperatura de 40°C ; la oxidación de ácidos grasos está relacionada directamente a los parámetros de temperatura y humedad disponible.

Si bien los ácidos grasos oxidados producidos no muestran correlación alguna a la formación de macamidas, el porcentaje de oxidación es un factor que debe considerarse para el monitoreo de la eficiencia de secado.

8. Conclusiones

En la evaluación del efecto de la temperatura de secado junto a otros factores como la forma de procesamiento de maca (rodajas y rallada) y la humedad sobre la liberación de ácidos grasos se encontró que la liberación de ácidos grasos es más dependiente de la velocidad de secado (humedad disponible) que a las temperaturas evaluadas (25°C, 30°C y 40°C).

La evaluación de las relaciones molares de ácidos grasos libres a bencilamina no estableció una relación entre el ratio molar de bencilamina y ácidos grasos con la tasa de macamidas. La tasa formación de macamidas luego de las 12 horas es independiente de disponibilidad de sus precursores putativos.

La caracterización preliminar de los ácidos oxidados reveló insaturaciones exclusivas en el carbono 12, estos patrones de oxidación son típicos de oxidaciones enzimáticas.

La evaluación de la cinética de ácidos grasos oxidados se observó elevados a bajas temperaturas y baja velocidad de secado señalan una formación exclusivamente enzimática; se puede inferir que la temperatura de 40°C tiene una ventaja sobre temperaturas más bajas porque no promueve la formación de ácidos grasos oxidados manteniendo la tasa de macamidas formadas. El secado industrial puede representar una importante herramienta, de ser optimizado, para producir macamidas controlando la cantidad de productos oxidados.

9.Sugerencias

Ya que la evidencia sugiere que tanto la formación de macamidas como la oxidación de ácidos grasos son procesos enzimáticos, se sugiere emplear protocolos de inhibición específicos para enzimas (como el ácido nordihidroguaiarético) para estudios del papel oxidativo de lipoxigenasas en maca.

Se sugiere la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas (HPLC/MS) como herramienta para futuros estudios en ácidos grasos y macamidas. Es complicado alcanzar buenos parámetros cuantitativos para macamidas por GC/MS.



10. Bibliografía

- Alaiz, M., Girón, J., Hidalgo, F.J., Maza, M.P. de la, Millán, F., Zamora, R., Vioque, E. 1989. Esterification of Amino Acids as Their 2,2-Bis(ethoxy-carbonyl)vinyl Derivatives. *Synthesis* 1989: 544-547.
- Almukadi, H., Wu, H., Böhlke, M., Kelley, C.J., Maher, T.J., Pino-Figueroa, A. 2013. The Macamide N-3-Methoxybenzyl-Linoleamide Is a Time-Dependent Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitor. *Molecular Neurobiology* 48: 333-339.
- Bach, B., Le Quere, S., Vuchot, P., Grinbaum, M., Barnavon, L. 2012. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. *Analytica Chimica Acta* 732: 114-119.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J., Veryser, L., De Tré, G., De Spiegeleer, B. 2012. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *Journal of Ethnopharmacology* 142: 563-590.
- Chen, J.-J., Zhao, Q., Liu, Y., Gong, P., Cao, L., Wang, X., Zhao, B. 2017. Macamides present in the commercial maca (*Lepidium meyenii*) products and the macamide biosynthesis affected by postharvest conditions. *International Journal of Food Properties* 0: 1-12.
- Chen, J.-J., Zhao, Q.-S., Liu, Y.-L., Zha, S.-H., Zhao, B. 2015. Identification of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) and its adulterants by a DNA-barcoding approach based on the ITS sequence. *Chinese Journal of Natural Medicines* 13: 653-659.
- Clément, C., Kneubühler, J., Urwyler, A., Witschi, U., Kreuzer, M. 2010. Effect of maca supplementation on bovine sperm quantity and quality followed over two spermatogenic cycles. *Theriogenology* 74: 173-183.
- Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212-228.
- Dini, A., Migliuolo, G., Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49: 347-349.
- Dobarganes, M.C., Velasco, J. 2002. Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 420-428.
- Esparza, E., Hadzich, A., Kofer, W., Mithöfer, A., Cosio, E.G. 2015. Bioactive maca (*Lepidium meyenii*) alkamides are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry* 116: 138-148.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- Frankel, E.N. 2014. *Lipid Oxidation*. Elsevier.
- Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li, X., Zhang, H. 2017. Correlations between Antioxidant Activity and Alkaloids and Phenols of Maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Food Quality*. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2017/3185945/> [Accedido 10 de noviembre de 2017].

- Ganzera, M., Zhao, J., Muhammad, I., Khan, I.A. 2002. Chemical Profiling and Standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 988-991.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E. 2007. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 608-613.
- Gonzales, G.F., Villaorduña, L., Gasco, M., Rubio, J., Gonzales, C. 2014. Maca (*Lepidium meyenii* Walp), a review of its biological properties. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 31: 100-110.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. 2007. *The Lipid Handbook with CD-ROM, Third Edition*. CRC Press.
- Hadzich, A. 2016. Metabolismo post-cosecha de Maca (*Lepidium meyenii*, Wapers) durante su secado tradicional e industrial, con énfasis en la formación de amidas. *Pontificia Universidad Católica del Perú*.
- Hajdu, Z., Lorántfy, L., Jedlinszki, N., Boros, K., Hohmann, J., Csupor, D. 2015. Quality control of maca-containing (*Lepidium meyenii* Walp.) dietary supplements. *Acta Alimentaria* 44: 461–467.
- Hajdu, Z., Nicolussi, S., Rau, M., Lorántfy, L., Forgo, P., Hohmann, J., Csupor, D., Gertsch, J. 2014. Identification of Endocannabinoid System-Modulating N-Alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. *Journal of Natural Products* 77: 1663-1669.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57: 303-333.
- Hermosín, I., Chicón, R.M., Dolores Cabezudo, M. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 83: 263-268.
- Jin, W., Chen, X., Dai, P., Yu, L. 2016. Lepidiline C and D: Two new imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae) roots. *Phytochemistry Letters* 17: 158-161.
- León, J. 1964. The “Maca” (*Lepidium meyenii*), a little known food plant of peru. *Economic Botany* 18: 122-127.
- Li, G., Ammermann, U., Quirós, C.F. 2001. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 55: 255-262.
- Liang, J., Wang, M., Li, X., He, X., Cao, C., Meng, F. 2017. Determination of Structural Requirements of N-Substituted Tetrahydro- β -Carboline Imidazolium Salt Derivatives Using in Silico Approaches for Designing MEK-1 Inhibitors. *Molecules* 22: 1020.
- Lieberman, M. 1983. *Post-Harvest Physiology and Crop Preservation*. Springer, New York, USA.

- Meissner, H.O., Mscisz, A., Mrozikiewicz, M., Baraniak, M., Mielcarek, S., Kedzia, B., Piatkowska, E. et al. 2015. Peruvian Maca (*Lepidium peruvianum*): (I) Phytochemical and Genetic Differences in Three Maca Phenotypes. *International Journal of Biomedical Science : IJBS* 11: 131-145.
- Mlakar, A., Spiteller, G. 1996. Distinction between enzymic and nonenzymic lipid peroxidation. *Journal of Chromatography A* 743: 293-300.
- Muhammad, I., Zhao, J., Dunbar, D.C., Khan, I.A. 2002. Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. *Phytochemistry* 59: 105-110.
- Pan, Y., Zhang, J., Li, H., Wang, Y.-Z., Li, W.-Y. 2015. Simultaneous Analysis of Macamides in Maca (*Lepidium meyenii*) with Different Drying Process by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* 9: 1686-1695.
- Pati, S., Nie, B., Arnold, R.D., Cummings, B.S. 2016. Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomedical Chromatography* 30: 695-709.
- Powers, C.N., Setzer, W.N. 2015. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In Silico Pharmacology* 3: 4.
- Quirós, C.F., Aliaga, R. 1997. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops* 21: 173–197.
- Rontani, J.-F., Aubert, C. 2008. Hydrogen and Trimethylsilyl Transfers During EI Mass Spectral Fragmentation of Hydroxycarboxylic and Oxocarboxylic Acid Trimethylsilyl Derivatives. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19: 66-75.
- Shrestha, R., Dixon, R.A., Chapman, K.D. 2003. Molecular Identification of a Functional Homologue of the Mammalian Fatty Acid Amide Hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 34990-34997.
- Stumpf, P.K. 2014. *The Biochemistry of Plants*. Elsevier.
- Tellez, M.R., Khan, I.A., Kobaisy, M., Schrader, K.K., Dayan, F.E., Osbrink, W. 2002. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry* 61: 149-155.
- Valentová, K., Buckiová, D., Křen, V., Pěkníková, J., Ulrichová, J., Šimánek, V. 2006. The in vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biology and Toxicology* 22: 91-99.
- Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A. 2007. Kinetics of the stability of broccoli (*Brassica oleracea* Cv. *Italica*) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2163-2170.
- Wang, Y., Wang, Y., McNeil, B., Harvey, L.M. 2007. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research International* 40: 783-792.

- Wu, H., Kelley, C.J., Pino-Figueroa, A., Vu, H.D., Maher, T.J. 2013. Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21: 5188-5197.
- Yábar, E., Pedreschi, R., Chirinos, R., Campos, D. 2011. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry* 127: 1576-1583.
- Yang, Q., Jin, W., Lv, X., Dai, P., Ao, Y., Wu, M., Deng, W., Yu, L. 2016. Effects of macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice. *Pharmaceutical Biology* 54: 827-834.
- Zhang, M., Wang, G., Lai, F., Wu, H. 2016. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii*. *Journal of agricultural and food chemistry* 64: 1921–1931.
- Zhang, M., Wu, W., Ren, Y., Li, X., Tang, Y., Min, T., Lai, F., Wu, H. 2017. Structural Characterization of a Novel Polysaccharide from *Lepidium meyenii* (Maca) and Analysis of Its Regulatory Function in Macrophage Polarization in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 1146-1157.
- Zhao, C., Xing, G.-S., Xu, R., Jin, D.-J., Duan, H.-Q., Xu, W.-G., Tang, S.-A. 2016. Rabdosia Acids A and B: Two New Lipids from *Rabdosia lophanthoides*. *Chemistry of Natural Compounds* 52: 205-207.
- Zhao, J., Avula, B., Chan, M., Clément, C., Kreuzer, M., Khan, I.A. 2012. Metabolomic differentiation of maca (*Lepidium meyenii*) accessions cultivated under different conditions using NMR and chemometric analysis. *Planta Medica* 78: 90-101.
- Zheng, B.L., He, K., Kim, C.H., Rogers, L., Shao, Y., Huang, Z.Y., Lu, Y. et al. 2000. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 55: 598-602.
- Zheng, B.L., Kim, C.H., Wolthoff, S., He, K., Rogers, L., Shao, Y., Zheng, Q.Y. 2001. Extract of *Lepidium meyenii* roots for pharmaceutical applications.

ANEXOS

Anexo 1. Composición de la maca comercial empleada.

Tabla 13: Composición de maca comercial empleada

	g/100 g de maca fresca	Confianza 95%
Humedad ^a	71.916	± 0.525
Proteínas ^b	10.604	± 0.894
Lípidos totales ^c	1.187	± 0.077

^aDeterminada según 5.2.4 Determinación de la humedad.

^bDeterminada con LECO CN. (multiplicando el factor 6.25 por el porcentaje de nitrógeno determinado)

^c Según sección 5.2.7

Para la determinación de los valores se emplea maca fresca comercial, los ensayos la determinación de los niveles de confianza se hicieron en tres muestras por triplicado cada una.



Anexo 2. Cromatogramas de fracción lipídica

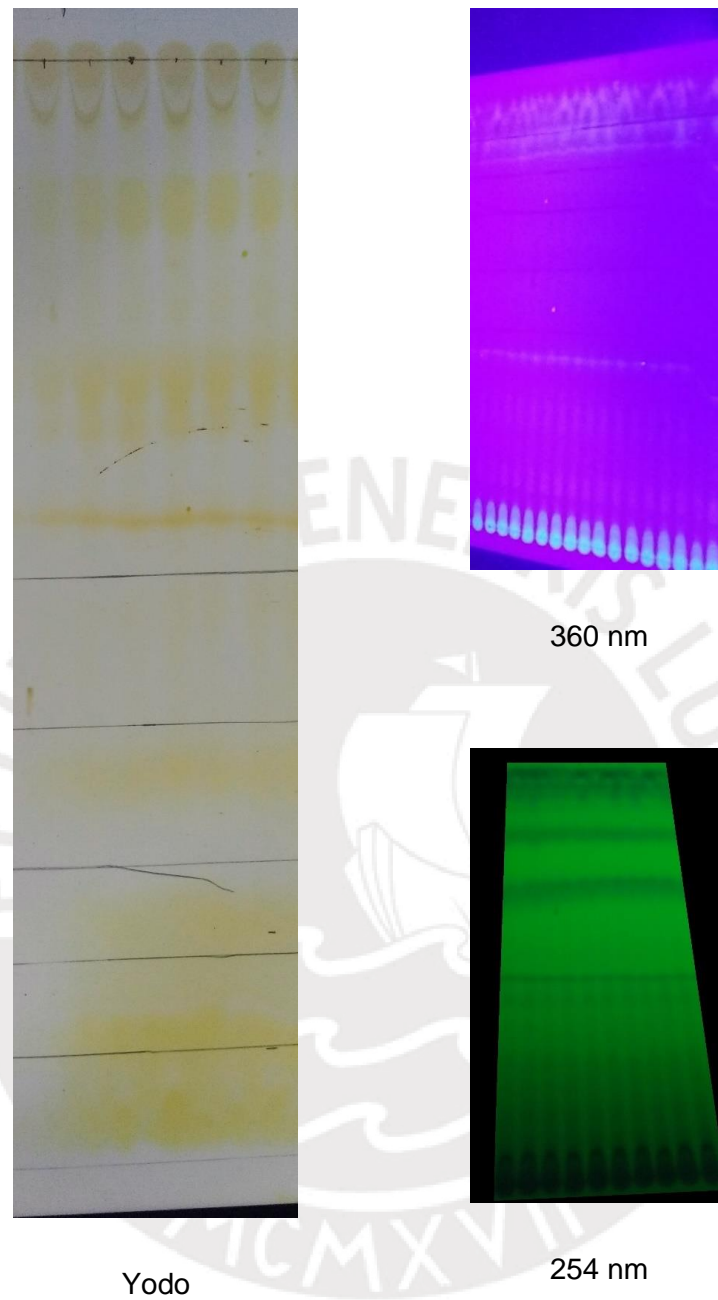


Figura 18: Cromatogramas de capa fina de la fracción lipídica

Las Zonas 1-7 (Tabla 11) fueron atribuidas de arriba –debajo de acuerdo a las manchas, claramente diferenciadas al revelarse con yodo.

Anexo 3. Recuperación de los procedimientos de extracción.

Extracción general de maca.

Sustancia	% Recuperación	Desviación Estándar Relativa	N
MAC16	79.4	3.5	9
BNH2	96.9	2.4	9
3metoxi-BNH2	97.6	1.6	9
4metoxi-BNH2	95.7	3.4	9

Extracción de ácidos grasos.

Sustancia	% Recuperación	Desviación Estándar Relativa	N
MAC16	97.1	1.2	9
C13:0	93.4	1.2	9

Anexo 4. Formación de macamidas en los experimentos de secado.

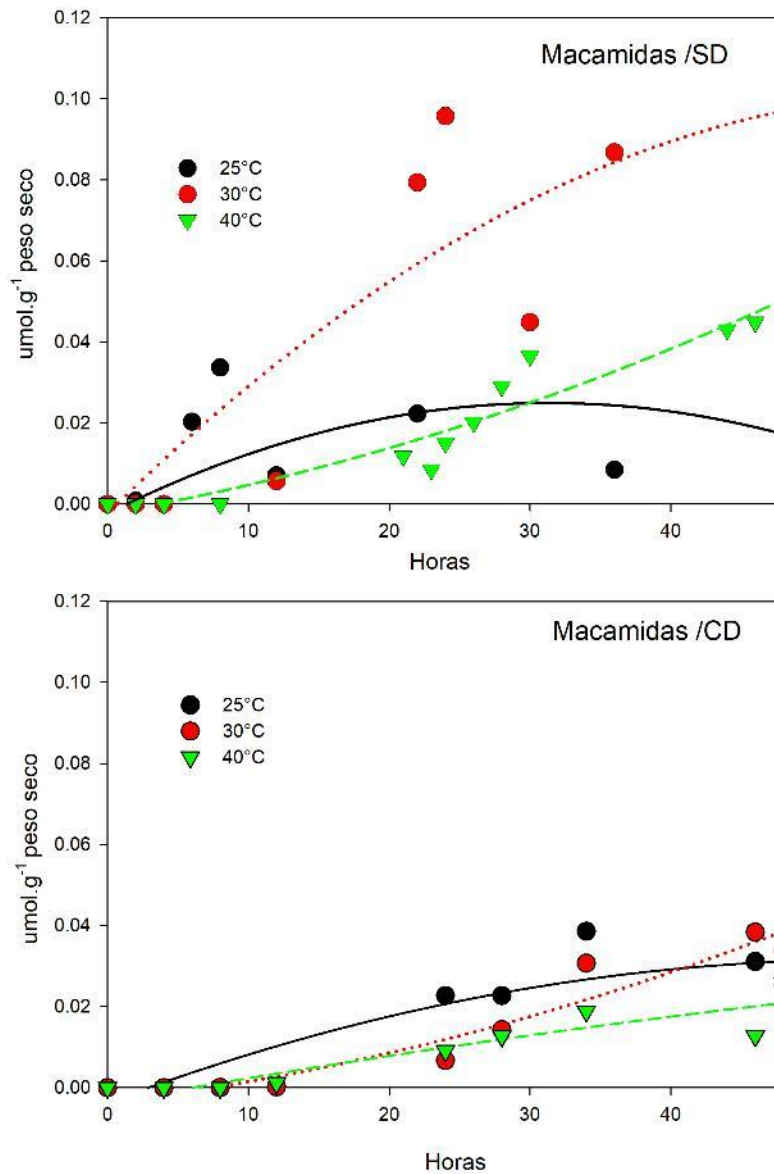


Figura 19: Formación de macamidas en experimentos de secado

Cinética de formación de macamidas en los experimentos de secado con desecante (CD) y sin desecante (SD).

La formación de macamidas es superior en los experimentos sin desecante que en los con desecante. La formación de macamidas no muestra relación a las temperaturas de secado empleadas.

Anexo 5. Valores acumulados de ácidos grasos, bencilamina y macamidas.

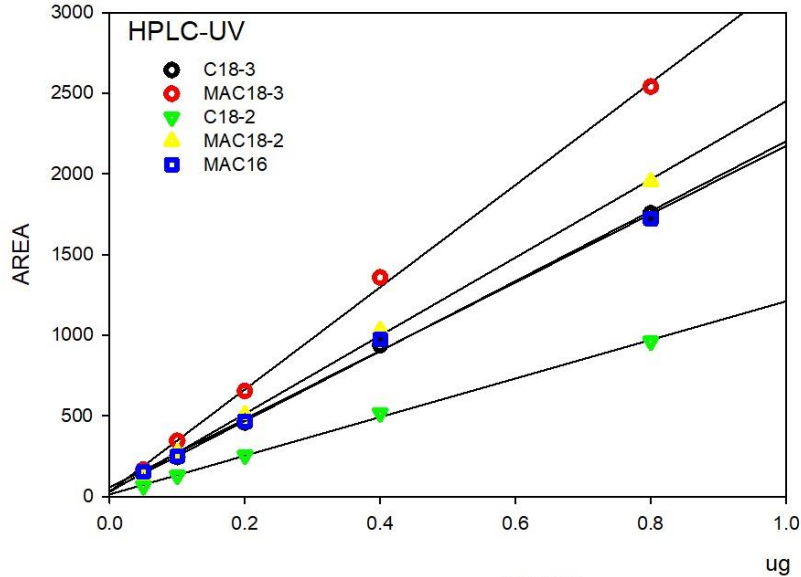
SECADO SIN DESECANTE						
Ácidos grasos acumulados						Observaciones
Temperatura	umol.g-1 PS	Error Std.^a	IC 95%^b	LI 95%^c	LS 95%^d	
25°C	1.0420	0.053	0.10388	0.9381	1.9801	*
30°C	1.3247	0.065	0.1274	1.1972	2.5219	*
40°C	0.6095	0.06	0.1176	0.4919	1.1014	*
Bencilamina generada						
Temperatura	umol.g-1 PS	Error Std.	IC 95%	LI 95%	LS 95%	
25°C	54.2346	10.1335	19.8616	34.3730	88.6076	*
30°C	68.9068	3.2130	6.2976	62.6093	131.5161	*
40°C	99.0705	6.9951	13.7105	85.3600	184.4305	*
Macamida formada						
Temperatura	umol.g-1 PS	Error Std.	IC 95%	LI 95%	LS 95%	
25°C	0.0592	0.004	0.0078	0.0514	0.1106	*
30°C	0.1331	0.009	0.0176	0.1155	0.2486	*
40°C	0.0643	0.006	0.0117	0.05258	0.1169	*
SECADO CON DESECANTE						
Ácidos grasos acumulados						Observaciones
Temperatura	umol.g-1 PS	Error Std.	IC 95%	LI 95%	LS 95%	
25°C	0.3460	0.0034	0.0067	0.3392	0.6851	*
30°C	0.3623	0.0003	0.0005	0.3618	0.7240	*
40°C	1.0841	0.0209	0.0409	1.0432	2.1273	
Bencilamina generada						
Temperatura	umol.g-1 PS	Error Std.	IC 95%	LI 95%	LS 95%	
25°C	25.8374	0.798	1.5641	24.2734	50.1108	
30°C	9.8440	0.827	1.6209	8.2231	18.0670	*
40°C	7.1019	0.606	1.1878	5.9141	13.0160	*
Macamida formada						
Temperatura	umol.g-1 PS	Error Std.	IC 95%	LI 95%	LS 95%	
25°C	0.0390	0.0002	0.0003	0.0386	0.0776	*
30°C	0.0444	1.53E-05	3.01E-05	0.0443	0.0887	*
40°C	0.0243	2.86E-05	5.59E-05	0.0243	0.0486	

aError Std. : Error estándar, b IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, c LI 95%: Límite inferior al 95% y dLS95%: Límite superior al 95%

Para los valores de ácidos grasos, bencilamina y macamidas acumulados a diferentes temperaturas señalados con (*) no son estadísticamente diferentes.

Anexo 6. Curvas de calibración para la cuantificación de ácidos grasos, bencilamina y amidas

Curvas de calibración para determinar macamidas y ácidos grasos libres por HPLC/UV.



C18-3 :

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0.9995 0.9991 0.9988 23.1824

Coefficient Std. Error t P

y0 35.4483 15.6946 2.2586 0.1091
a 2166.8325 38.0091 57.0082 <0.0001

MAC18-3 :

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0.9993 0.9987 0.9983 40.2625

Coefficient Std. Error t P

y0 30.5225 27.2579 1.1198 0.3444
a 3168.3513 66.0130 47.9959 <0.0001

C18-2 :

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0.9993 0.9986 0.9981 15.7699

Coefficient Std. Error t P

y0 14.1055 10.6763 1.3212 0.2782
a 1196.0567 25.8558 46.2588 <0.0001

MAC18-2 :

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0.9997 0.9993 0.9991 21.9097

Coefficient Std. Error t P

y0 29.3392 14.8329 1.9780 0.1423
a 2421.1241 35.9223 67.3989 <0.0001

MAC16 :

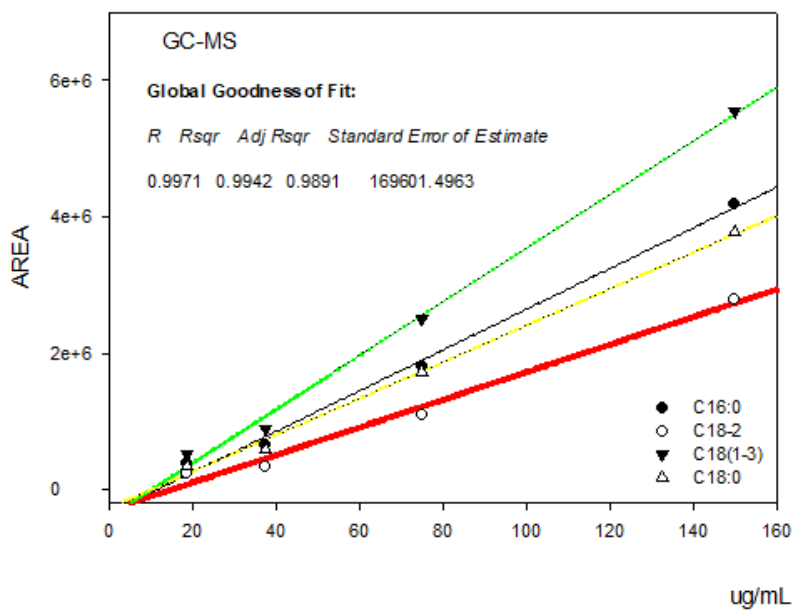
R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0.9981 0.9962 0.9949 46.1785

Coefficient Std. Error t P

y0 56.9222 31.2630 1.8208 0.1662
a 2117.3904 75.7126 27.9662 0.0001

Curvas de calibración para ácidos grasos libres totales y oxidados por GC/MS



C16:0
 Coefficient Std. Error t P
 y0 -342804.9674 151162.4018 -2.2678 0.1515
 a 29831.5462 1748.8923 17.0574 0.0034

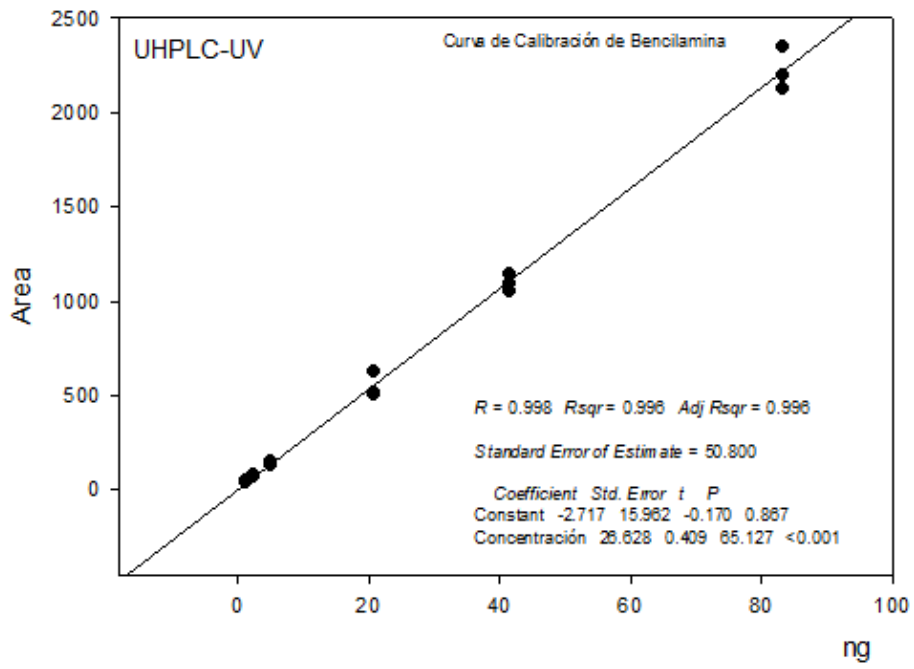
C18:0
 Coefficient Std. Error t P
 y0 -276283.6533 111392.5620 -2.4803 0.1313
 a 26767.6920 1288.7701 20.7700 0.0023

C18:2
 Coefficient Std. Error t P
 y0 -313719.8934 150127.3532 -2.0897 0.1718
 a 20244.4749 1736.9171 11.6554 0.0073

C18:(1-3)
 Coefficient Std. Error t P
 y0 -405422.5521 165065.9603 -2.4561 0.1334
 a 39368.5199 1909.7511 20.6145 0.0023



Curvas de calibración para determinar bencilamina por UHPLC/UV



Anexo 7. Estabilidad del producto de derivatización DEEMM

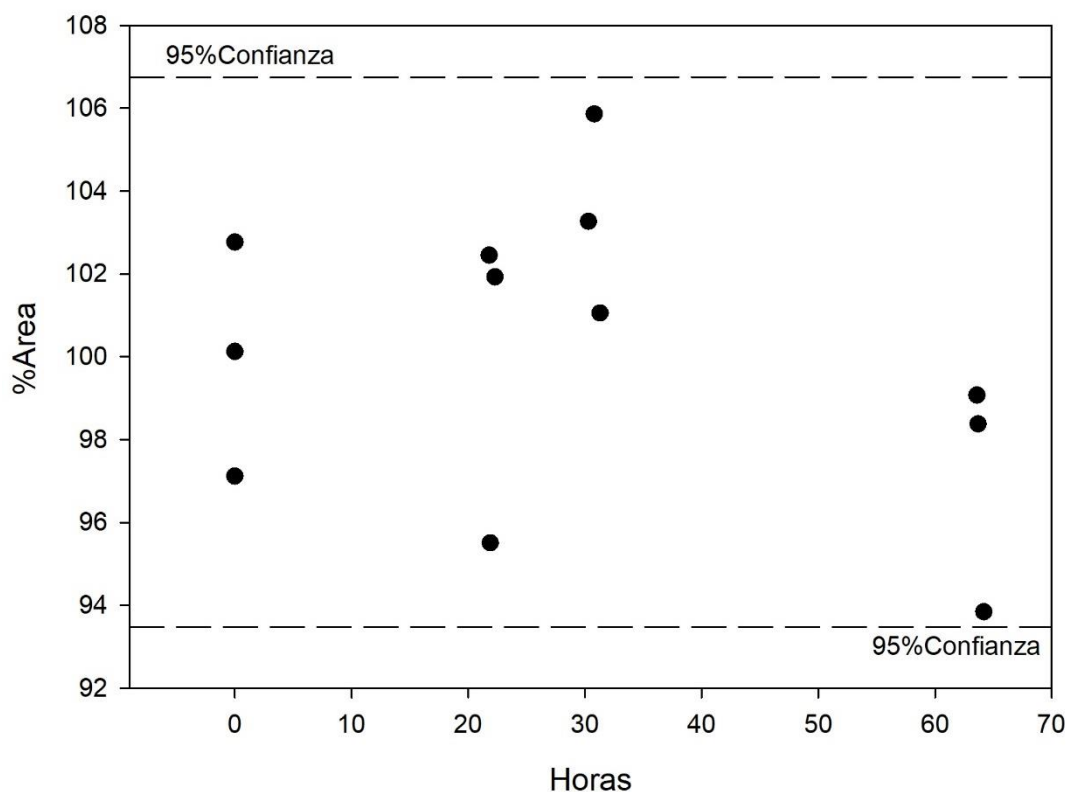


Figura 20: Estabilidad de derivatización de bencilamina

Se grafica los valores de % de área obtenidos para las mismas muestras monitoreadas en el tiempo.

En la Figura 20, todos los valores determinados están dentro del intervalo de confianza del promedio de % de área inicial determinado, el método de derivatización resulta en productos estables luego de 60 horas de la derivatización de la muestra.

Anexo 8. Cromatograma, espectro de masas y probables fragmentaciones de las sustancias identificadas.

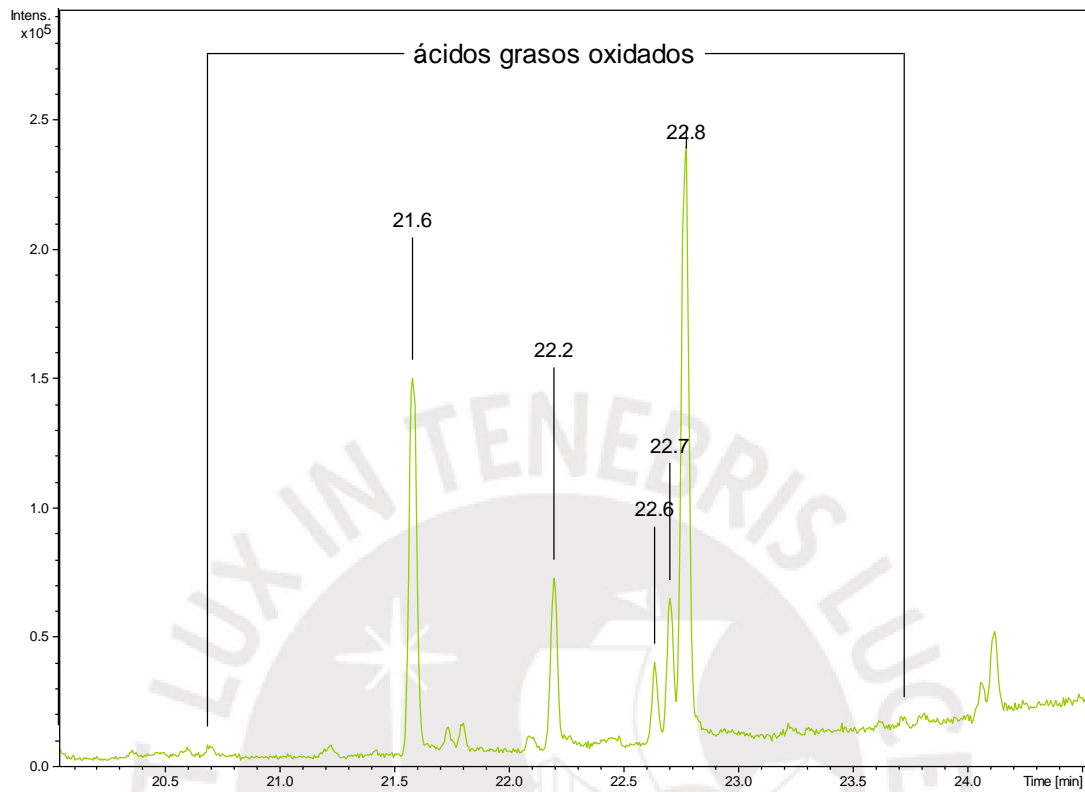


Figura 21: Cromatograma de ácidos grasos oxidados

Espectros de masas, fragmentos y abundancia.

Sustancia 21.6

Fragmento	[M+H] ⁺	% Abundancia	RSD*
A	73.1	100	1.12E-05
B	361.2	97	2.77E-04
C	217.1	89	3.03E-05
D	147.1	30	3.53E-05
E	103.1	30	1.96E-03
F	437.2	27	8.42E-04
G	129.1	24	1.30E-03
H	75	19	5.91E-05
I	169.1	16	1.12E-04
J	271.1	14	1.81E-03
K	319.1	13	3.34E-03

*RSD: Desviación estándar relativa

Sustancia 22.2

Fragmento	[M+H] ⁺	Abundancia [%]	RSD
A	73.1	100	2.39E-05
B	217.1	72	7.96E-04
C	361.2	71	7.24E-04
D	289.1	31	1.24E-04
E	147.1	28	2.36E-03
F	129	27	2.48E-03
G	437.2	27	1.91E-03
H	103.1	24	2.96E-03
I	75	24	2.90E-03
J	271	16	6.54E-03
K	169.1	14	4.90E-03
L	243	11	1.17E-02
M	157	11	5.71E-03
N	207	11	6.07E-03

Sustancia 22.6

Fragmento	[M+H] ⁺	Abundancia	
		[%]	RSD
A	73	100	3.93E-05
B	361.2	99	1.11E-03
C	217.1	40	3.79E-03
D	103.1	33	3.18E-03
E	147.1	32	3.77E-03
F	207	23	4.45E-03
G	129	20	4.35E-03
H	365.2	17	2.20E-04
I	379.1	13	2.67E-04
J	77	12	8.63E-03
K	191.1	11	2.81E-02

Sustancia 22.8

Fragmento	[M+H] ⁺	Abundancia	
		[%]	RSD
A	73.1	100	8.43E-06
B	217.1	70	3.28E-04
C	361.2	64	2.95E-05
D	289.1	51	3.37E-04
E	147	32	6.91E-04
F	103	27	1.49E-03
G	129	25	8.92E-04
H	75	21	3.95E-05
I	437.3	20	1.24E-03
J	169.1	16	1.56E-03
K	271.1	13	1.80E-03
L	319.2	13	1.82E-03
M	117	11	2.54E-03

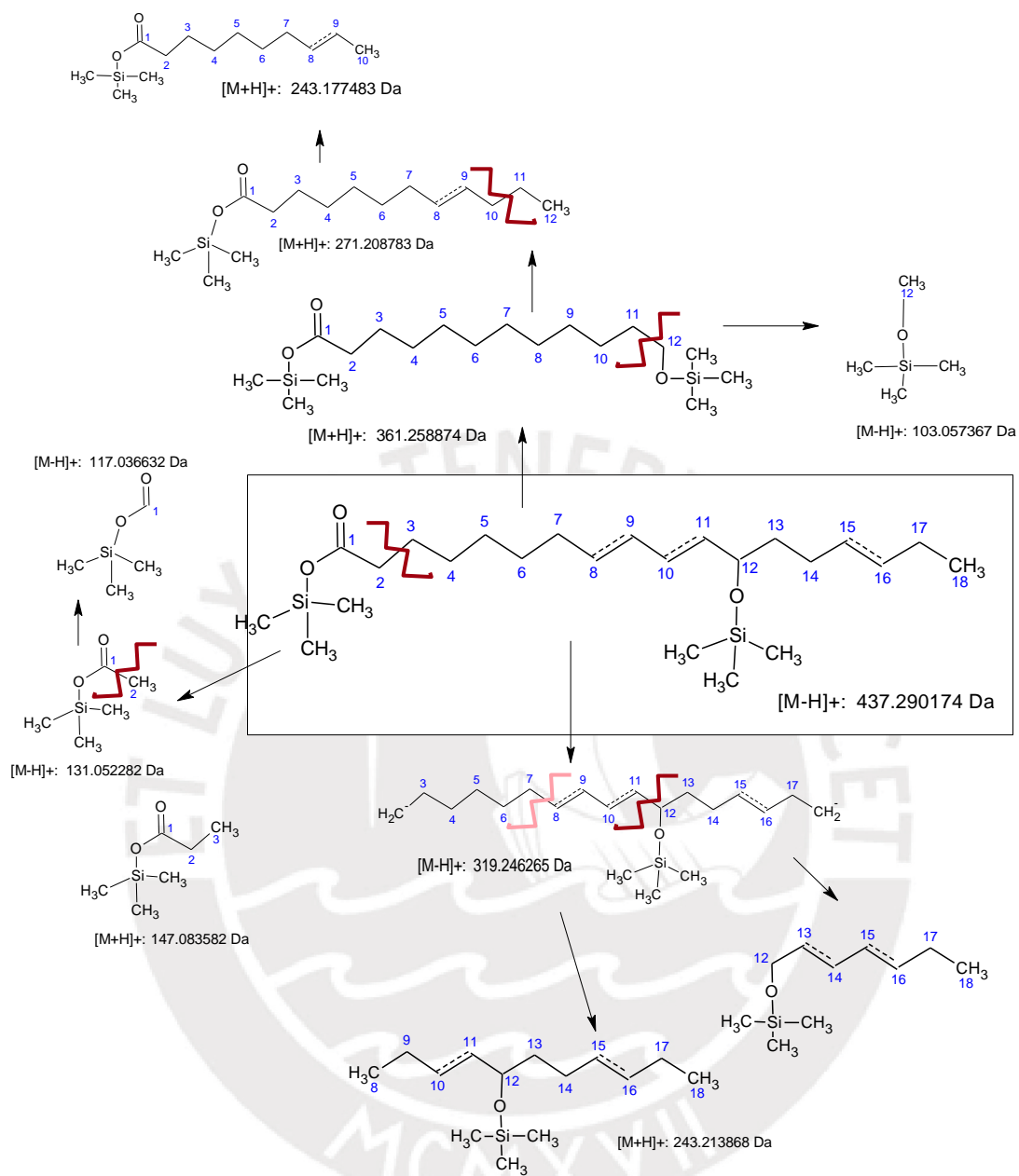


Figura 22: Esquema de fragmentación de los ácidos grasos oxidados

Esquema de fragmentación propuesto para los ácidos grasos detectados en la fracción de ácidos grasos. El esquema fue elaborado tomando como referencia los modelos de fragmentación propuestos por Rontani (Rontani y Aubert, 2008).