

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



Modulación del metabolismo postcosecha de glucosinolatos en maca (*Lepidium meyenii*)

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA

**AUTORA**

Winnie Yingli Yi Wu Acuy

**ASESOR**

Eric Gabriel Cosio Caravasi

Lima, enero, 2020

## Resumen

La maca es una planta nativa andina que se cultiva sobre los 4000 m s. n. m. en Junín y Pasco (Perú) y que es utilizada como alimento o medicina tradicional desde tiempos precolombinos. Este tubérculo ha sido objeto de numerosos estudios y se ha confirmado su alto valor nutricional y energizante ya que se han identificado ecompuestos bioactivos en maca tales como bencilglucosinolato, bencilisocianato y alcamidas benciladas. Este último grupo de compuestos, alcamidas benciladas, tienen un papel estimulador en el sistema nervioso central y son marcadores de actividad biológica en esta raíz ya que solo se les ha reportado en ella. Por este motivo se les denominó macamidas.

Estudios previos han confirmado que no existen macamidas en maca fresca. Se determinó que la formación de macamidas ocurre exclusivamente durante el proceso de secado. Esparza y colaboradores (2015) estudiaron la cinética de su formación realizando experimentos de secado en campo durante nueve semanas e imitando el proceso en laboratorio en 24 horas en los que se identificaron y monitorearon los metabolitos precursores de las macamidas y, de este modo, se pudo plantear una vía tentativa que lleva a su acumulación.

En el presente trabajo, se buscó conocer de manera más detallada las vías degradativas de glucosinolatos durante el proceso de secado de maca y cómo estas determinan la formación de bencilamina, un precursor directo de la formación de las amidas bioactivas, además de evaluar vías colaterales que resultan en la formación de productos no deseables, como ácido benzoico. El proyecto requirió poder emular el secado en campo bajo condiciones de laboratorio en periodos cortos de tiempo, y no 10 semanas como ocurre en el secado tradicional. Se llevó a cabo un monitoreo de los metabolitos que participan en la formación de bencilamina y de los productos terminales del proceso de secado. Para el monitoreo de los metabolitos, se utilizaron tres métodos de extracción por ultrasonido en diferentes solventes: 70% metanol, diclorometano y diclorometano acidificado y se analizaron los extractos por cromatografía líquida o de gases.

## Agradecimiento

A Dios, por todo.

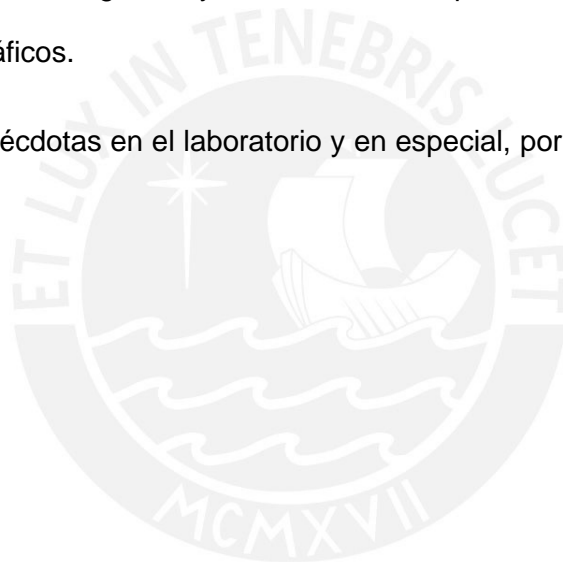
A mi familia, por apoyarme en todo momento.

Al Dr. Eric Cosio, por la orientación y apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al proyecto 023-2016-INIA/UPMSI/IE, por el financiamiento de esta tesis.

A Fabián Limonchi y Eliana Esparza por enseñarme a cómo trabajar en el laboratorio y ayudarme durante esta investigación y a Hector Flores por su apoyo en los análisis de laboratorio y cromatográficos.

A Silvia, por muchas anécdotas en el laboratorio y en especial, por su compañía en los días más largos.



## Tabla de contenido

1. Introducción .....	9
1.1. Proceso de secado de maca.....	10
1.1.1. Secado en campo.....	10
1.1.2. Secado industrial .....	10
1.2. Compuestos principales.....	11
1.3. Estudios previos de la hidrólisis de glucosinolatos y el metabolismo postcosecha de maca .....	12
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Materiales .....	20
3.1. Material vegetal .....	20
3.2. Solventes y reactivos.....	20
3.3. Materiales y equipos.....	22
3.4. Instrumentos.....	24
4. Métodos.....	25
4.1. Análisis de metabolitos volátiles.....	25
4.1.1. Experimento de secado de maca.....	25
4.1.2. Método de análisis de volátiles .....	26
4.2. Análisis de metabolitos por extracción .....	27
4.2.1. Experimento de secado de maca.....	27

4.2.2.	Prueba de humedad residual .....	28
4.2.3.	Extracción metanólica.....	28
4.2.4.	Extracción clorofórmica para el análisis de los metabolitos volátiles .....	32
4.2.5.	Extracción clorofórmica para el análisis de ácido benzoico.....	34
5.	Resultados y discusión .....	37
5.1.	Análisis de metabolitos volátiles.....	37
5.1.1.	Condiciones de los experimentos de secado .....	37
5.1.2.	Caracterización de compuestos .....	38
5.1.3.	Muestreo por HS-SPME .....	39
5.2.	Análisis de metabolitos por extracción .....	42
5.2.1.	Caracterización de compuestos bencilados .....	42
5.2.2.	Caracterización de ácido benzoico .....	43
5.2.3.	Condiciones de los experimentos de secado .....	44
5.2.4.	Muestreo de maca para las extracciones.....	45
6.	Conclusiones .....	52
7.	Bibliografía.....	53

## Índice de tablas

Tabla 1. Contenido de macamidas y otros metabolitos	15
Tabla 2. Programa GC cromatográfico para análisis de volátiles	27
Tabla 3. Programa HPLC cromatográfico para análisis de BNH2	29
Tabla 4. Programa HPLC cromatográfico para análisis de BGL	30
Tabla 5. Programa de solventes para análisis de MAC y FFA en UHPLC	31
Tabla 6. Condiciones para análisis de MAC y FFA en UHPLC-APCI-MS	31
Tabla 7. Iones registrados en la señal de SIM de polaridad positiva en APCI-MS en los distintos periodos durante la separación	32
Tabla 8. Iones registrados en la señal de SIM de polaridad negativa en APCI-MS en los distintos periodos durante la separación	32
Tabla 9. Programa GC cromatográfico para el análisis de BITC	33
Tabla 10. Programa GC cromatográfico para el análisis de compuestos bencilados	34
Tabla 11. Programa GC-MS cromatográfico para análisis de BCOOH	35
Tabla 12. Programa GC-FID cromatográfico para análisis de BCOOH	36
Tabla 13. Humedad residual de muestras de maca después de 72 horas de secado en horno	38
Tabla 14. Valores máximos obtenidos a partir del perfil cinético de cada compuesto	40
Tabla 15. Iones seleccionados para la cuantificación	43
Tabla 16. Valores máximos obtenidos a partir de la curva graficada para cada compuesto	46
Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson de los metabolitos	47

## Índice de figuras

Figura 1. Estructuras moleculares de bencilglucosinolato y de sus productos de degradación hidrolítica	11
Figura 2. Tres macamidas representativas	12
Figura 3. Reacciones propuestas para el metabolismo de BITC por Goosen	13
Figura 4. Reacciones propuestas para el metabolismo de BNH <sub>2</sub> por Mutlib	14
Figura 5. Reacciones de Cannizzaro entre BCHO y su especie hidratada	14
Figura 6. Reacción de tipo Cannizzaro biocatalizada por enzimas tipo aldehído deshidrogenasa	15
Figura 7. Perfil cinético de metabolitos	16
Figura 8. Ruta biosintética de macamidas	17
Figura 9. Sistema para el secado por flujo	26
Figura 10. Perfil cromatográfico característico de GC de volátiles emitidos durante el secado de maca	39
Figura 11. Perfil cinético de metabolitos volátiles emitidos durante el secado de maca a 35 °C	41
Figura 12. Superposición de cromatogramas de GC-FID de BCOOH	44
Figura 13. Perfil de humedad residual	45
Figura 14. Perfil cinético de metabolitos durante el secado de maca	47
Figura 15. Propuesta de la biosíntesis del ácido benzoico y otros metabolitos bencilados en maca bajo condiciones de secado	51

## Siglas o abreviaturas

APCI	Ionización química a presión atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
BCHO	Benzaldehído
BCN	Bencilnitrilo
BCOOH	Ácido benzoico
BGL	Bencilglucosinolato
BIOC	Bencilisocianato
BITC	Bencilisotiocianato
BNH <sub>2</sub>	Bencilamina
BOH	Bencilalcohol
EMV	Voltaje del multiplicador de electrones ( <i>Electron Multiplier Voltage</i> )
FFA	Ácidos grasos libres ( <i>Free Fatty Acids</i> )
FID	Detector de ionización de llama ( <i>Flame Ionization Detector</i> )
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HS- SPME	Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza ( <i>Head Space</i> )
m s. n. m.	Metros sobre el nivel del mar
MAC	Macamidas
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MMI	Inyector multimodo ( <i>Multimode Inlet</i> )
MS	Espectrómetro de masas
MSTFA	N-trimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology (EE.UU.)</i>
OPA	o-Ftaldialdehído



RP-18	Cartuchos de extracción en fase sólida en fase reversa con octadecilo ligado
SAX	Fuerte intercambiador aniónico ( <i>Strong Anion Exchange</i> )
SIM	Monitoreo selectivo de iones ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )
SPE	Extracción en fase sólida
TIC	Corriente iónica total ( <i>Total Ion Current</i> )
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución ( <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> )
UV	Ultravioleta



## 1. Introducción

La maca (*Lepidium meyenii* Walp.) es una planta anual que se cultiva sobre 4000 m s. n. m. en los andes centrales de Perú (Junín y Pasco). Pocas plantas soportan las bajas temperaturas, fuertes vientos e intensa luz solar de este hábitat.<sup>1-3</sup> Esta planta andina pertenece al género *Lepidium* (familia *Brassicaceae*); sin embargo, no ha sido tan estudiada como las plantas del mismo género en Norteamérica y en Europa.<sup>4</sup> A pesar de haber sido utilizada como alimento y medicina tradicional por siglos debido a sus propiedades estimulantes y promotoras de la salud, su estudio exhaustivo a nivel agronómico y bioquímico solo se inició hace pocas décadas.<sup>3,4</sup>

El interés por productos de maca aumentó a inicios de la década de 1990 ya que reportes en la literatura científica confirmaron la visión tradicional sobre su alto poder nutricional y valor energizante.<sup>4</sup> Esto se ve reflejado en un aumento de la demanda comercial y en el incremento del valor de exportación de la maca en Perú. En el año 2000, el valor de exportación (FOB) fue de US\$ 1 427 107. En el 2006, fue de US\$ 3 772 269. En el último registro de SIICEX en el 2016, el valor de FOB fue de US\$15 046 903 en harina, sémola y polvo de maca.<sup>5,6</sup>

El proceso de secado incrementa el sabor dulce de la maca debido a la degradación de almidón por acción de amilasas endógenas,<sup>1</sup> lo que lo hace más agradable. Además, este proceso sirve para su mejor conservación.<sup>2</sup> Tradicionalmente, el secado se hace en campo en uno a dos meses e, industrialmente, se completa bajo condiciones controladas. La importancia del secado se debe a que el proceso postcosecha es determinante para obtener un producto de composición adecuada, es decir, que contenga la mayor cantidad de metabolitos de interés por su bioactividad y evitar la presencia de productos no deseados.<sup>5,7</sup> Algunos productos no deseados son el bencilalcohol (BOH) que posiblemente da sabor amargo a la maca y el ácido benzoico (BCOOH) que es regulado porque se utiliza como preservante en alimentos.<sup>8,9</sup>

## **1.1. Proceso de secado de maca**

### **1.1.1. Secado en campo**

La maca se cosecha después de 6 o 7 meses de la siembra, que es cuando los hipocotilos tienen su máximo tamaño. Luego, se retiran las hojas, se limpian y se suelen secar en el campo bajo el sol por 1 o 2 meses ya que depende del tamaño de los hipocotilos y los días soleados.<sup>1,2,5</sup> Durante este periodo, la maca está expuesta a la intensa radiación solar y a los cambios de temperatura del día y de la noche característicos de la puna. Para determinar cuándo se debe retirar la maca del secado en campo, los agricultores la prueban para saber si se eliminó el sabor amargo característico de la maca fresca. Si el sabor es dulce, los agricultores proceden a recogerlas del campo para consumirlas o guardarlas.<sup>1</sup>

### **1.1.2. Secado industrial**

Actualmente, existen varias presentaciones para la comercialización de la maca. El principal producto es la harina de maca; otros productos son en rodajas, gelatinizados y liofilizados. Para obtener estos productos, previamente pasan por un proceso de secado industrial.<sup>10,11</sup> A diferencia del secado en campo que, está expuesto a variabilidad climática que puede influenciar fuertemente el perfil de productos bioactivos finales, la producción comercial busca procesar las raíces en condiciones controladas utilizando hornos y secadores solares o de aire forzado.<sup>7,10</sup> Actualmente este proceso sólo se utiliza en las fases finales del procesamiento, con producto que ya secó parcialmente en campo. El lograr un procesamiento industrial estandarizado, para así disminuir el tiempo de secado y obtener un producto más homogéneo y de mejor calidad requiere conocer mejor los procesos bioquímicos que tienen lugar en las raíces de maca durante su secado.

## 1.2. Compuestos principales

Un estudio sobre la composición de la maca secada al aire demuestra su alto valor nutricional, ya que contiene 10.2% de proteínas, 59.0% de carbohidratos, 2.2% de lípidos y 8.5% de fibra. Además, se encontró un alto contenido de aminoácidos esenciales en las proteínas y que los ácidos grasos se dividen en 40.1% de ácidos grasos saturados y 52.7% de ácidos insaturados. Los ácidos grasos más abundantes son los siguientes: ácido linoleico (32.6%), palmítico (23.8%) y oleico (11.1%).<sup>12</sup>

Además, se han identificado varios metabolitos secundarios que son los productos de la hidrólisis de los glucosinolatos. En la Figura 1, se muestra la hidrólisis del glucosinolato mayoritario reportado por Li y col,<sup>13</sup> bencilglucosinolato (BGL). La presencia de estos metabolitos ayuda a explicar la actividad biológica atribuida a la maca.<sup>3,14,15</sup> Sin embargo, bencilnitrilo (BCN) y bencilalcohol (BOH) son productos alternos que influyen en la calidad organoléptica e inocuidad del producto. Si se acumulan en el producto, BCN es tóxico y BOH en concentraciones bajas confiere un tono floral y sabor afrutado pero en concentraciones mayores puede dar un sabor amargo a la harina.<sup>16</sup>

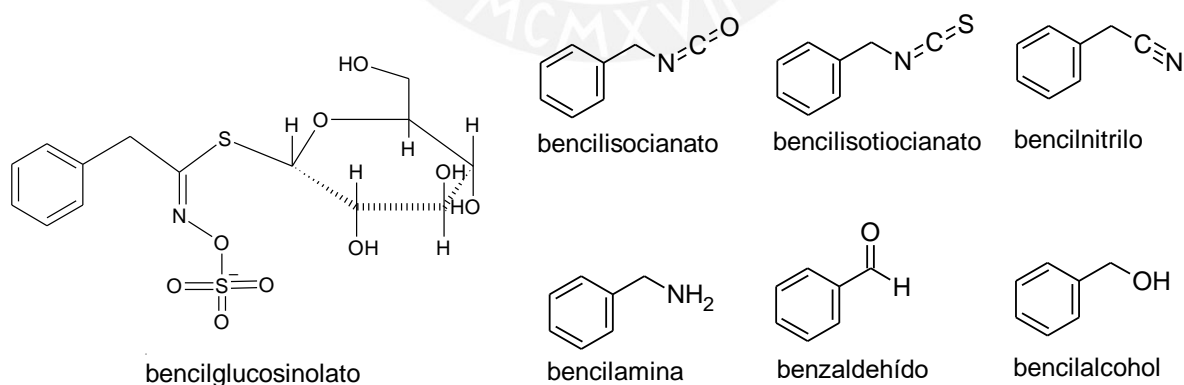


Figura 1. Estructuras moleculares de bencilglucosinolato y de sus productos de degradación hidrolítica

Los principales productos bioactivos de este cultivo andino por su papel estimulador en el sistema nervioso central son las alcanidas benciladas: macamidas (MAC).<sup>17</sup> En la Figura 2, se muestran tres ejemplos de estructuras de estos compuestos; sin embargo, no son las únicas.<sup>3</sup>

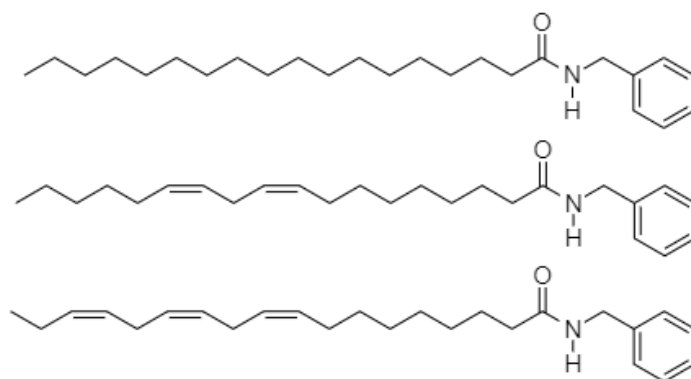


Figura 2. Tres macamidas representativas<sup>3</sup>

### 1.3. Estudios previos de la hidrólisis de glucosinolatos y el metabolismo postcosecha de maca

Se conoce poco sobre el metabolismo postcosecha de glucosinolatos en maca, pero se han realizado diversos estudios en otras Brassicaceas<sup>18</sup> que ayudan a dilucidar la secuencia de reacciones. De este modo, se sabe que la hidrólisis de los glucosinolatos es catalizada por las mirosinas que son tioglucosidasas. Esta reacción es una defensa de las plantas frente a herbivoría que resulta en la liberación de sustancias tóxicas: nitrilos, isotiocianatos y tiocianatos.<sup>18,19</sup> Goosen y colaboradores reportaron en el 2001<sup>20</sup> sobre los metabolitos de BGL en mamíferos formados como resultado de su incubación con citocromo P450 en un sistema microsomal reconstituido y propusieron un esquema de reacciones mostrado en la Figura 3. El esquema muestra similitudes en el procesamiento microsomal de isotiocianatos entre mamíferos y plantas y sugiere las vías de interconversión entre productos que se observan en harina de maca, tales como bencilamina (BNH<sub>2</sub>), producto acumulativo primario en harina

de maca del metabolismo de bencilisotiocianato (BITC) y productos e intermediarios menores como benzaldehído (BCHO), bencilisocianato (BIOC) y ácido benzoico (BCOOH).<sup>20</sup> Este último es relevante ya que es un preservante en comidas y su contenido se encuentra regulado en casi todos los países para asegurar la idoneidad del producto.<sup>9</sup> Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la concentración adecuada de BCOOH para inhibir microorganismos es entre 300 y 2 000 mg/kg.<sup>21</sup> Investigaciones recientes han evaluado el uso de BCOOH para regular la función intestinal en animales; de este modo, promover su crecimiento y salud. Mao y colaboradores<sup>22</sup> aseguran que el ácido podría utilizarse como producto para la salud intestinal en humanos. Sin embargo, todavía se deben de realizar investigaciones sobre su mecanismo de acción y efecto sobre la función intestinal y su microbiota para así determinar la dosificación apropiada para humanos.

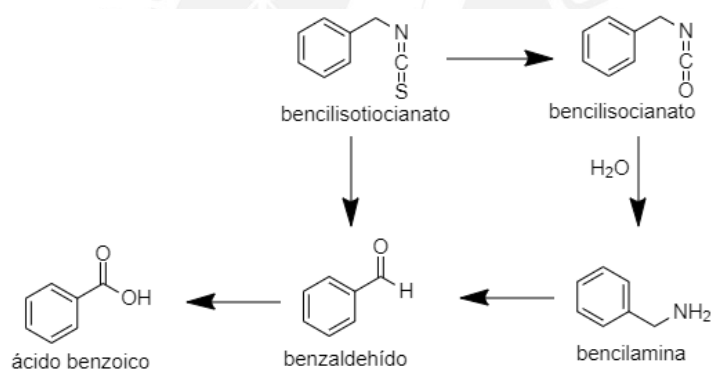


Figura 3. Reacciones propuestas para el metabolismo de BITC por Goosen<sup>20</sup>

Mutlib y colaboradores<sup>23</sup> complementaron los estudios de Goosen<sup>20</sup> llevando a cabo un estudio del metabolismo de BNH2 en roedores. El producto final mayoritario de su metabolismo es ácido hipúrico, un conjugado de glicina con ácido benzoico. A partir de este resultado, propusieron una ruta por vía de BCHO; a partir de la conversión de BNH2 a BCHO, se forma BCOOH por oxidación mitocondrial y BOH por reducción (Figura 4).

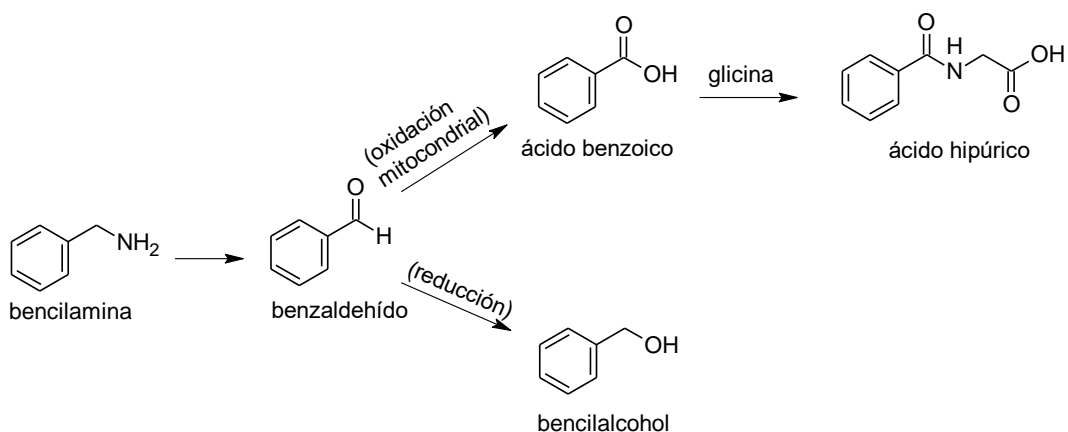


Figura 4. Reacciones propuestas para el metabolismo de BNH<sub>2</sub> por Mutlib<sup>23</sup>

Una alternativa para la generación de ácido benzoico y bencilalcohol de manera simultánea es la Reacción de Cannizzaro<sup>24</sup> que ocurre espontáneamente en medio básico. El BCHO se encuentra en equilibrio con su forma hidratada, fenilmetanodiol, ambas moléculas reaccionan mientras que BCHO se reduce a BOH, fenilmetanodiol se oxida a BCOOH (Figura 5).

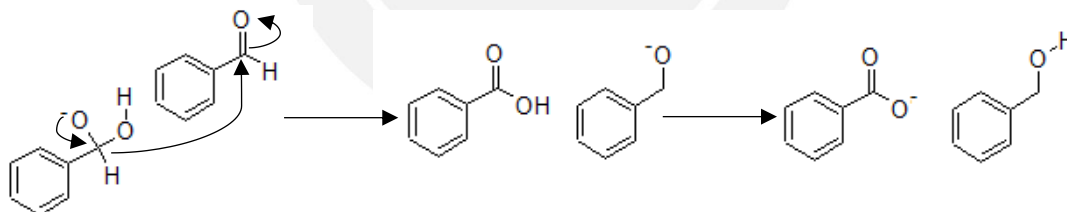


Figura 5. Reacciones de Cannizzaro entre BCHO y su especie hidratada<sup>24</sup>

En sistemas biológicos, se ha propuesto un fenómeno similar catalizado por aldehído deshidrogenasas (ADH) en las que se produce una reacción de desproporción de aldehídos como mecanismo de desintoxicación para obtener moléculas menos reactivas como alcoholes y ácidos carboxílicos (Figura 6).<sup>25</sup> En estos casos la proporción alcohol/ácido carboxílico no siempre es equimolar, debido a que la reducción es ligeramente más favorecida.

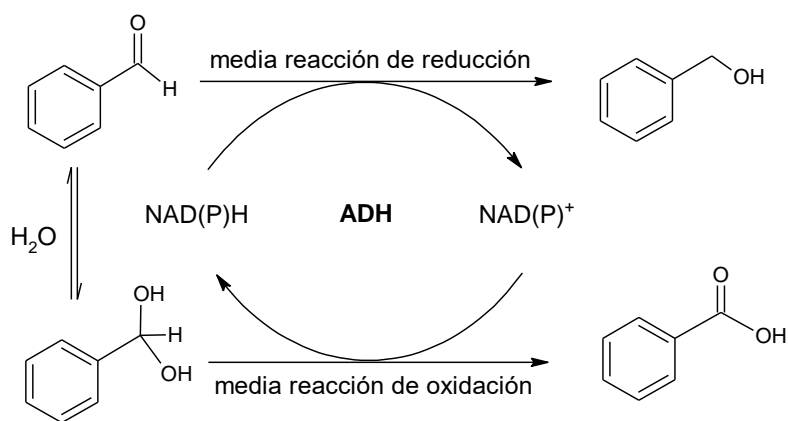


Figura 6. Reacción de tipo Cannizzaro catalizada por enzimas tipo aldehído deshidrogenasa<sup>25</sup>

Como se mencionó anteriormente, el producto primario del metabolismo de BITC en maca es la bencilamina, que se acumula en concentraciones molares entre uno y dos órdenes de magnitud mayores que la del resto de productos. Esparza y colaboradores<sup>3</sup> reportaron en el 2015 la correlación entre la acumulación de bencilamina, ácidos grasos libres y macamidas y que sólo se podía observar macamidas en harina de maca seca pero no en maca fresca o maca liofilizada (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de macamidas y otros metabolitos<sup>3</sup>

Metabolito	Maca fresca liofilizada ( $\mu\text{g/g}$ de peso seco)	Maca secada tradicionalmente ( $\mu\text{g/g}$ de peso seco)
MAC	$12 \pm 2$	$629 \pm 97$
BNH2	$470 \pm 70$	$3200 \pm 400$
FFA	$47 \pm 3$	$600 \pm 112$

En el mismo reporte, se cuantificó BGL, BNH2, FFA, BITC y MAC durante el proceso de secado por HPLC. En la Figura 7, se muestran los perfiles cinéticos de los metabolitos durante las nueve semanas de secado en campo. En el primer panel, se muestra el perfil de humedad residual de la muestra de maca que evidencia la lenta pérdida de agua en el tejido. En los demás gráficos, se observa la tendencia decreciente de BGL que evidencia ser consumido durante el proceso de secado; que existe una relación entre BNH2 y BITC ya que sus perfiles



son inversos, es decir, el BITC podría ser un precursor de BNH<sub>2</sub>; por último, que FFA y MAC tienen tendencias similares.

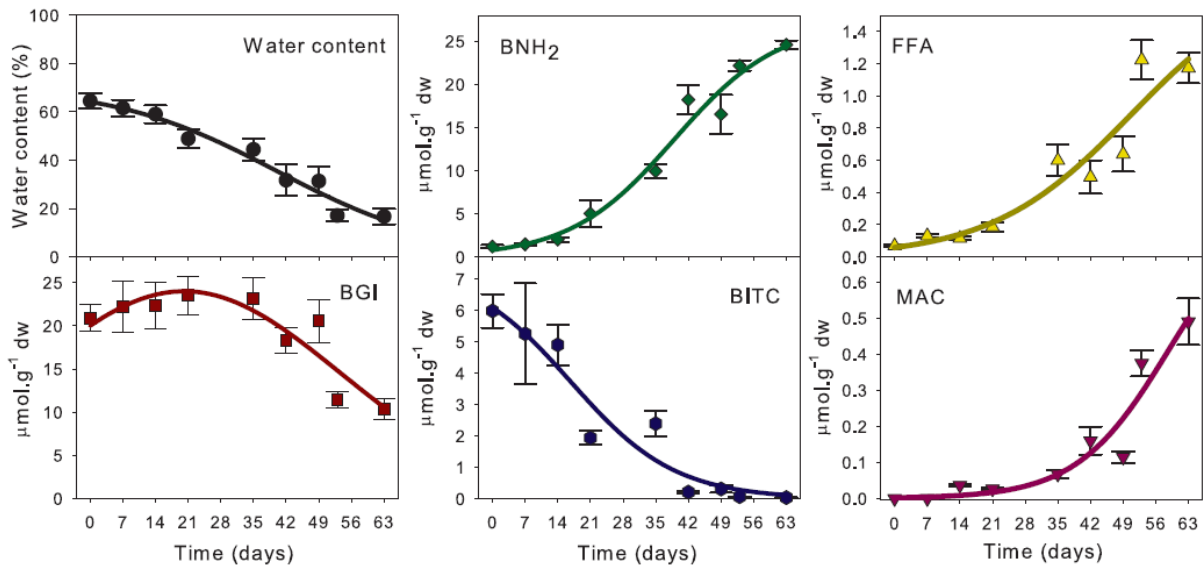


Figura 7. Perfil cinético de metabolitos<sup>3</sup>

Basándose en estos resultados, se propuso una ruta para la síntesis de macamidas (Figura 8) a partir de la hidrólisis de glucosinolatos catalizada por mirosinasas.<sup>3</sup> Esta propuesta, identifica a BNH<sub>2</sub> y FFA como los responsables de la formación de las MAC.

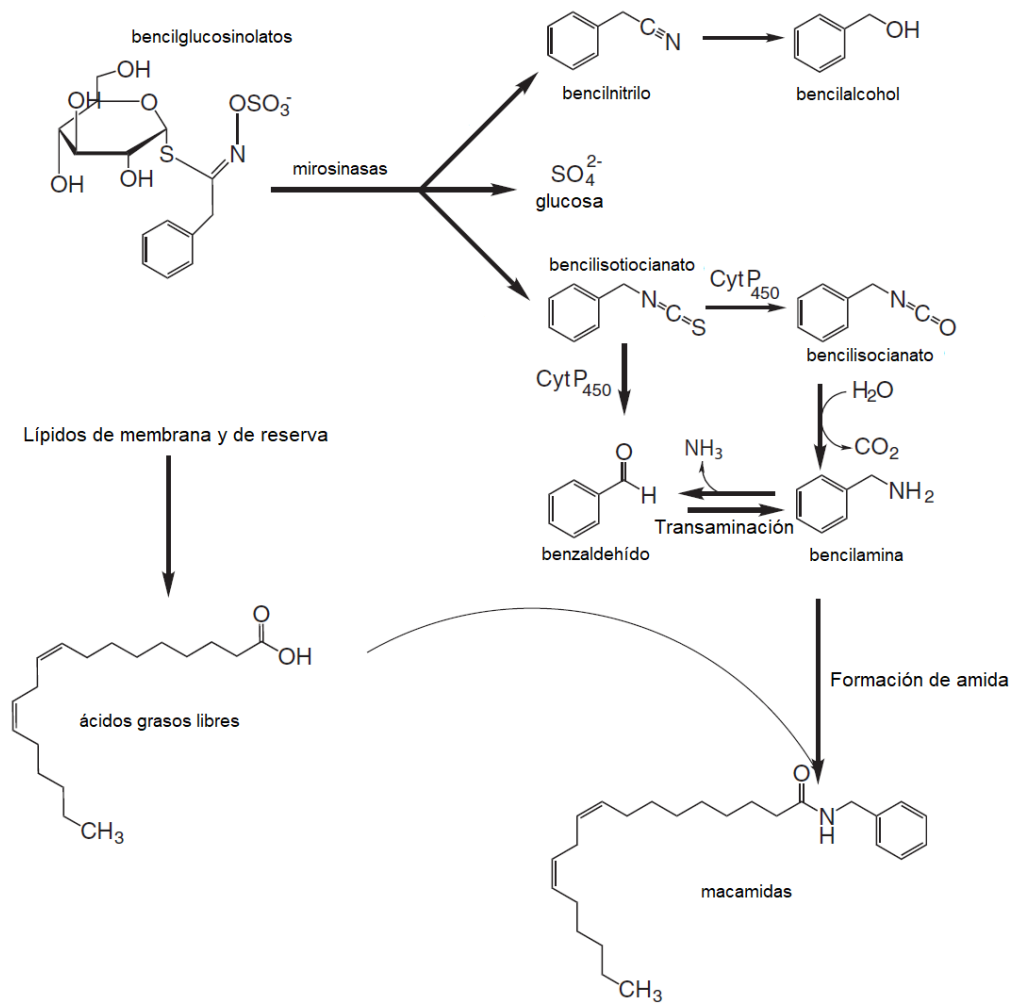


Figura 8. Ruta biosintética propuesta para macamidas<sup>3</sup>

Sin embargo, aún las interrelaciones existentes entre los compuestos bencilados formados a partir de la hidrólisis de bencilglucosinolato y su contribución al perfil químico y organoléptico final de la harina de maca no está clara. Para contribuir a clarificar este aspecto, este trabajo propuso una serie de experimentos que podrían aportar mayor información sobre las relaciones existentes entre los distintos metabolitos bencilados en base a sus perfiles cinéticos. Por ello, el primer objetivo fue el intentar emular el secado en campo bajo condiciones controladas en el laboratorio en periodos cortos de tiempo, pero suficientemente largos para que se den los procesos enzimáticos. Resultados anteriores<sup>3</sup> donde se reportaron los perfiles cinéticos del secado de 24 horas mostraron la necesidad de realizar procesos de

secado más lentos para tener mayor resolución de los perfiles. El segundo objetivo fue cuantificar los productos de la hidrólisis de bencilglucosinolato para conocer sus perfiles cinéticos y sus interrelaciones. El tercer objetivo fue realizar el monitoreo dinámico de los compuestos bencilados, productos de la hidrólisis de BGL, para conocer las vías colaterales a la formación de BNH2 que resultan en la formación de productos no deseables como BOH y BCOOH.



## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Explorar el catabolismo de bencilglucosinolato que determina la formación de bencilamina, precursor de las macamidas bioactivas, y de otros metabolitos bencilados menores que influyen en el perfil organoléptico y bioquímico de la harina de maca.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Emular el secado en campo bajo condiciones controladas, en laboratorio, en periodos cortos de tiempo pero que permitan emular el metabolismo postcosecha de glucosinolatos en maca.
- Cuantificar los compuestos bencilados que son presumibles productos de la hidrólisis de bencilglucosinolato: ácido benzoico, bencilalcohol, bencilisocianato, bencilisotiocianato, bencilnitrilo y benzaldehído.
- Realizar el monitoreo dinámico de los presumibles metabolitos que participan en la formación de bencilamina, precursor directo de la formación de macamidas, y de los productos terminales del proceso de secado.

### 3. Materiales

#### 3.1. Material vegetal

Se adquirieron hipocótilos frescos de maca amarilla de 3 cm de diámetro del mercado del distrito de Magdalena del Mar (Lima, Perú).

#### 3.2. Solventes y reactivos

Los solventes utilizados fueron de grado HPLC y MS adquiridos en JT Baker y Merck, y agua ultra pura tipo 1. Los reactivos usados fueron de grado analítico y los gases fueron de grado UHP 5.

##### JT Baker (Phillipburg, EE.UU.)

- Ácido clorhídrico concentrado
- Hidróxido de sodio (98,2%)
- Sulfato de sodio anhidro (99,0%)

##### Linde (Callao, Perú)

- Nitrógeno
- Helio
- Nitrógeno líquido

##### Merck (Darmstadt, Alemania)

- Ácido benzoico (99,9%)
- Ácido trifluoroacético (99,8%)
- Bencilamina (99%)

##### Santa Cruz Biotechnology

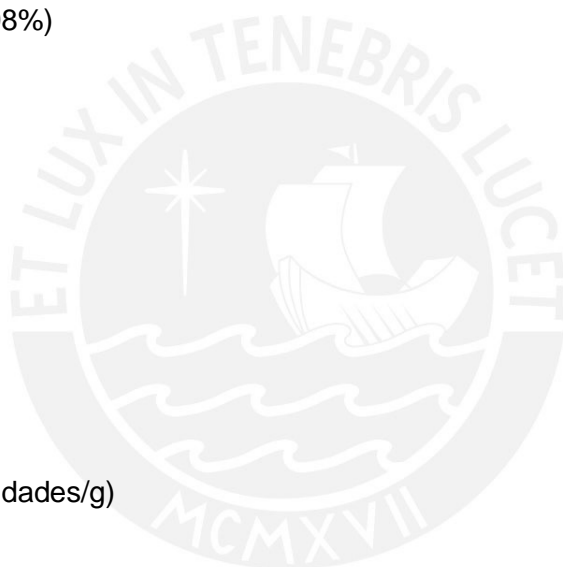
- Hidrato de sinigrina (98%)

Sigma-Aldrich (Missouri, E.E.U.U.)

- 2-mercaptoetanol (99%)
- Ácido esteárico (99%)
- Ácido linoleico (99%)
- Ácido linolénico (99%)
- Ácido oleico (99%)
- Ácido palmítico (99%)
- Bencilalcohol (99,8%)
- Bencilisocianato (99%)
- Bencilisotiocianato (98%)
- Bencilnitrilo (99%)
- Benzaldehído (99%)
- Carbón activado
- MES (99,5%)
- MSTFA (98,5%)
- OPA (99%)
- Sulfatasa (10 000 unidades/g)

Universidad de Copenague (Dinamarca)

- Bencilglucosinolato (98%)



### 3.3. Materiales y equipos

#### ACD Labs

- ACD/ChemSketch (Freeware) 2018.2.5, versión C60E41

#### Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.)

- Columna DB-5 para cromatógrafo de gases (30 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de espesor)
- Columna VF-23ms (30 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de espesor)
- Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m)
- Columnas de extracción en fase sólida Bond Elut SAX, 500 mg (3 mL)
- Insertos de vidrio de 250  $\mu$ L para vial
- Software MassHunter GC/MS Acquisition, versión B.07.00 SP2. 1654
- GC ChemStation, versión Rev. C.01.05 [35]
- LC ChemStation, versión Rev. C.01.07 SR2 [255]
- Viales de 2 mL con tapa rosca con fondo de teflón (PTFE)

#### Bios International Corporation (New Jersey, EE.UU.)

- Calibrador de flujo de aire DryCal DC-Lite

#### Branson ultrasonic (EE.UU.)

- Baño de ultrasonido Branson 5800

#### Eppendorf (Hamburgo, Alemania)

- Microcentrífuga de mesa 5417C
- Concentrador centrífugo plus 5305

#### Hamilton Company (Nevada, EE.UU.)

- Jeringas Gastight de 25  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 250  $\mu$ L y 1 000  $\mu$ L

#### 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  
Merck (Darmstadt, Alemania)
- Columna LiChrospher 100 RP-18 (5µm) LiChroCART 125-4
- Columnas de extracción en fase sólida LiChrolut RP-18, 500 mg (3 mL)  
National Institute of Standards and Technology
- Base de datos de espectros de masas NIST 2011, versión 2.0 g.  
OHAUS (EE.UU.)
- Balanza analítica AX224  
Pace Scientific (Carolina de Norte, EE.UU.)
- Registrador de data XR5-SE
- Sensor de temperatura y humedad TRH-100
- Software LogXR, versión 1.01.77.  
Precision Scientific Inc. (Illinois, EE.UU.)
- Incubadora de laboratorio  
Systat Software GmbH (Erkath, Alemania)
- Sigmaplot, versión 12.0  
Supelco (Pennsylvania, EE.UU.)
- Fibras SPME: fibras de sílica fundida con una capa de 30 µm de divinil benceno/carboxeno/polidimetilsiloxano  
Taylor-Wharton Cryogenics (Alabama, EE.UU.)
- Envase criogénico, serie CX-100  
VENUS AQUA (Guangdong, China)
- Bomba de aire para acuario AP-308A  
VWR (Pennsylvania, EE.UU.)



- Bloque termostatzado analógico

Waters-Millipore (Billerica, EE.UU.)

- Estación de procesamiento para SPE, Sep Pak Vacuum Manifold, para 12 cartuchos.

WTW (Alemania)

- Incubadora TS 606/2

### **3.4. Instrumentos**

Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.)

- Cromatógrafo de gases Agilent 7890A equipado con detector de ionización de llama (GC-FID)
- Cromatógrafo de gases Agilent 7890B acoplado a un detector de masas 5977A (GC-MS)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1260 Infinity II con detector UV-VIS de arreglo de diodos (HPLC)
- Cromatógrafo de líquidos de ultra alta presión Agilent 1290 Infinity acoplado a un detector UV-VIS de arreglo de diodos en serie con un detector de masas Agilent 6120B de cuadrupolo simple con interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI).

## **4. Métodos**

Los métodos utilizados para el análisis de los metabolitos volátiles, bencilamina, bencilglucosinolato, ácidos grasos y macamidas son los métodos descritos por Esparza y colaboradores<sup>3</sup>, pero con algunas modificaciones.

### **4.1. Análisis de metabolitos volátiles**

#### **4.1.1. Experimento de secado de maca**

Para el análisis del secado, las macas fueron lavadas con agua, sumergidas en una solución de lejía al 5% en agua por 10 minutos para desinfectarlas y enjuagadas con agua hasta perder el olor característico de la lejía. Luego, se utilizó un rallador de cocina para obtener fragmentos de 0,5 cm de ancho, y se colocaron 10 g de maca rallada sobre una rejilla metálica en una recámara de vidrio de 600 mL con cinco puertos de acceso, tres de ellos con septos de inyección, uno para el sensor de temperatura y humedad, y dos para el ingreso y salida del flujo de aire (Figura 9). La recámara tenía un flujo de aire constante (40 mL/min) suministrado por una bomba de acuario y previamente filtrado con un filtro de carbón activado. Todo el sistema se mantuvo dentro de una incubadora a 35°C.

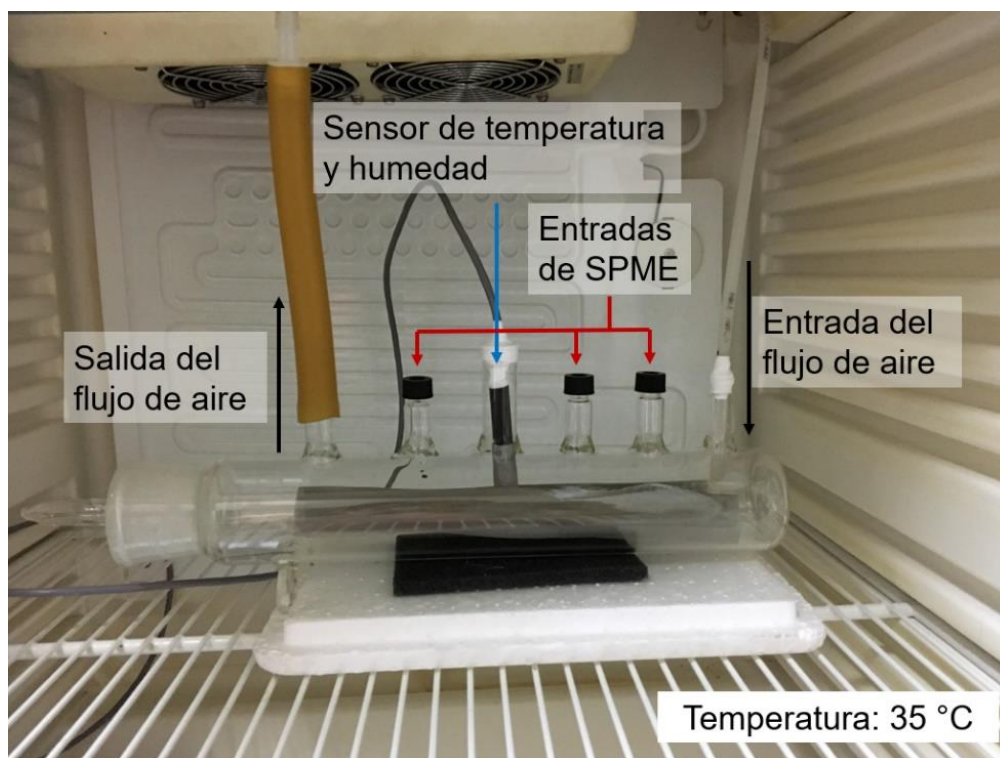


Figura 9. Sistema para el secado por flujo. Las flechas negras indican la entrada y la salida del flujo de aire, la flecha celeste señala al sensor de temperatura y humedad y las flechas rojas indican cuáles son los puertos de inyección de las fibras de SPME.

#### 4.1.2. Método de análisis de volátiles

Se utilizaron fibras de SPME que se acondicionaron por 15 minutos en el inyector del cromatógrafo a 270 °C. Estas se colocaron en cada entrada y fueron expuestas por 15 minutos en el aire de la recámara, inmediatamente se inyectan al puerto del GC-MS y se exponen por 8 minutos.

El método de separación para el análisis de compuestos volátiles que se usó fue el descrito por Esparza y colaboradores,<sup>3</sup> con algunas modificaciones. En la Tabla 2, se muestran las condiciones del método de separación.

Tabla 2. Programa GC cromatográfico para análisis de volátiles

<b>Temperatura del inyector</b>	250 °C
<b>Modo de división de flujo</b>	Splitless
<b>Flujo del gas portador (helio)</b>	1,0 mL/min
<b>Columna</b>	VF-23ms
<b>Temperatura del horno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isotérmico a 45 °C por 4 minutos</li> <li>- Gradiente de 15 °C/min hasta 190 °C</li> <li>- Gradiente de 30 °C/min hasta 240 °C</li> <li>- Isotérmico a 240 °C por 2 minutos.</li> </ul>

La identificación de compuestos se realiza mediante el uso de estándares puros y la biblioteca de espectros de masas NIST 2011.

#### 4.2. Análisis de metabolitos por extracción

##### 4.2.1. Experimento de secado de maca

La temperatura del horno de laboratorio se mantuvo a 35 °C, pero, en esta ocasión, se colocaron 16 rejillas cuadradas metálicas (10 cm x 10 cm x 1 cm) con 40 g de macas ralladas (640 g) en una recámara de 80 L generada aislando la mitad del volumen de la incubadora con una plancha de policarbonato y sellando las salidas de aire. Para poder lograr el secado entre las 48 y 72 horas, se generó humedad dentro de la recámara colocando una esponja humedecida con 1 L de agua destilada e ingresando un aire húmedo de 1,2 L/min. Este aire húmedo es generado por una bomba de aire que sopla a través de una trampa de carbón activado y por una recámara de 500 mL con 200 mL de agua destilada a 19 °C (temperatura

del laboratorio) y, de este modo, arrastra vapor de agua. Para el seguimiento de la cinética, se retiraron una o dos rejillas a las 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas del inicio del secado. Las muestras se homogenizaron, pesaron y congelaron en nitrógeno líquido.

#### **4.2.2. Prueba de humedad residual**

Se pesó 1 g de muestra de maca de una rejilla en una placa Petri y se dejó a 110 °C por una hora. Luego, se retira la placa del horno, se deja enfriar por 15 minutos y se vuelve a pesar. Este proceso se realiza por triplicado. Utilizando la relación del peso de la maca secada a 110 °C y el peso de la muestra, se calcula la humedad residual que permite conocer los pesos secos de cada muestra.

#### **4.2.3. Extracción metanólica**

Para la extracción metanólica, se utilizó 1 g de peso seco de maca para cada punto. La muestra se colocó en un tubo cónico Falcon de 15 mL y se añadieron 10 mL de 70% metanol (30% v/v de agua) a 70 °C, rápidamente se colocó en un baño María a 70 °C por 10 minutos. Luego, se colocó en un baño de ultrasonido de 40 Hz a 50 °C por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se filtró al vacío con un filtro GF/A y el filtrado se recibió en un tubo cónico Corning de 50 mL. Se realizó una segunda extracción por 10 minutos en el baño de ultrasonido que se recibió en el mismo tubo, se burbujeó con nitrógeno líquido y se guardó a -20°C hasta analizarlo.

##### **4.2.3.1. Análisis de bencilamina en HPLC**

Se preparó el reactivo de OPA con 27 mg de OPA en 0,5 mL de etanol; 5 mL de buffer borato de sodio y 25 µL de 2-mercaptoetanol. Luego en un microtubo de centrifuga de 1,5 mL; se colocaron 180 µL de extracto; 20 µL de tiramina 0,73 mM; 25 µL de buffer de borato de sodio 0,4 M (pH 9.5) y 25 µL de reactivo de OPA. Se agitó en vortex por 1 minuto, se centrifugó por 2 minutos a 10 000 x g, se trasvasaron 180 µL de la mezcla y se inyectaron 10 µL para el análisis por HPLC (Tabla 3). Se utilizó una columna Merck LiChrospher 100 RP-18, 125 mm x 4 mm i.d. (5 µm).

Tabla 3. Programa HPLC cromatográfico para análisis de BNH2

<b>Temperatura</b>	30°C
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL
<b>Longitud de onda de detección</b>	340 nm
<b>Gradientes de solventes</b> A: metanol B: acetato de sodio (20 mM, pH 6,0)	- Desde 40% A hasta 100% A en 9 minutos - Isocrático a 100% A por 4 minutos

% A: proporción del solvente A con respecto al flujo total

#### 4.2.3.2. Análisis de bencilglucosinolatos en HPLC

En una columna de extracción en fase sólida Agilent Bond Elut-SAX (500 mg), se cargó 1 mL de extracto metanólico de maca y 1 mL de sinigrina 0,03 mM (estándar interno) que se lavó con 70% MeOH; se acondicionó con 1 mL de buffer de 0,02 M MES (pH 5,2); se añadieron 300 µL de sulfatasa (150 unidades) y se incubó por 16 horas. Al día siguiente, se eluyó los desulfoglucosinolatos con 800 µL de 70% MeOH y 800 µL de agua. Se utilizó el mismo equipo de HPLC que para el análisis de bencilamina y se utilizó una columna Merck LiChrospher 100 RP-18, 250 mm x 4 mm i.d. (5 µm). El método utilizado se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Programa HPLC cromatográfico para análisis de BGL

<b>Temperatura del horno</b>	30°C
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL
<b>Detección</b>	230 nm
<b>Gradiente de solventes</b> A: acetonitrilo B: agua	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desde 2% A hasta 20% A en 15 minutos</li> <li>- Desde 20% A hasta 80% A en 3 minutos</li> <li>- Isocrático a 80% A por 2 minutos</li> <li>- Desde 80% A hasta 2% A en 2 minutos</li> <li>- Isocrático a 2% A por 5 minutos</li> </ul>

% A: proporción del solvente A con respecto al flujo total

#### 4.2.3.3. Análisis de macamidas y ácidos grasos libres en UHPLC-APCI-MS

Se diluyeron 5 mL del extracto metanólico con 5 mL de agua. Los 10 mL se cargaron en una columna de extracción en fase sólida de fase reversa (Merck Lichrolut RP-18, 500 mg). La columna se lavó con 5 mL de 50% metanol y se eluyó con 2 mL metanol. Se analizó por UHPLC-APCI-MS y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18. El método utilizado fue desarrollado en el laboratorio para detectar los ácidos grasos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico) y sus respectivas macamidas. El programa cromatográfico se detalla en las Tabla 5 - Tabla 8.

Tabla 5. Programa de solventes para análisis de MAC y FFA en UHPLC

<b>Tiempo (min)</b>	<b>H<sub>2</sub>O %(v/v)</b>	<b>ACN %</b>	<b>MeOH %</b>
0	33	65	2
2,4	33	65	2
3,6	14	85	1
15,6	0	100	0
21	0	100	0
24	33	65	2
27	33	65	2

Tabla 6. Condiciones para análisis de MAC y FFA en UHPLC-APCI-MS

<b>Temperatura</b>	40 °C
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL
<b>Nebulización e ionización</b>	Temperatura del gas: 250 °C Temperatura de vaporización: 400 °C Flujo del gas de secado: 9,0 L/min Presión de nebulización: 25 psig Voltaje de capilar (positivo y negativo): 4 000 V Corona (positivo y negativo): 4,0 µA
<b>Monitoreo de iones (SIM)</b>	50% del tiempo en polaridad positiva y 50%, en polaridad negativa



Tabla 7. Iones registrados en la señal de SIM de polaridad positiva en APCI-MS en los distintos periodos durante la separación. . El potencial de ionización utilizado fue 200 V y la ganancia, 1 EMV.

Tiempo (min)	Grupo	SIM (m/z)
0	1	382, 384 y 386
8	2	368
9.7	3	370
11.7	4	346 y 372
15	5	374

Tabla 8. Iones registrados en la señal de SIM de polaridad negativa en APCI-MS en los distintos periodos durante la separación. El potencial de ionización utilizado fue 200 V y la ganancia, 1 EMV.

Tiempo (min)	Grupo	SIM (m/z)
0	1	291, 293 y 295
7	2	277
9	3	279
10.5	4	255 y 281
13	5	283

#### 4.2.4. Extracción clorofórmica para el análisis de los metabolitos volátiles

Se utilizó 1 g de peso seco de maca para la extracción clorofórmica. En un tubo de vidrio de 50 mL, se colocaron 20 mL de diclorometano y se añadió toda la muestra. Luego, se agitó en un vortex por 30 segundos y se dejó en un baño de ultrasonido por 1 hora a 30 °C. Después se pasó el extracto por una "columna" de sulfato de sodio con un filtro GF/A en un embudo y se colectó en un tubo de vidrio de 50 mL. El extracto se guardó a -20 °C hasta analizarlo.

##### 4.2.4.1. Análisis de bencilisotiocianato en GC-MS

El volumen de inyección utilizado para este análisis fue 1  $\mu$ L del extracto de muestra. Se analizó por GC-MS equipado por una columna VF-23ms (Agilent). En la Tabla 9, se muestran las condiciones del equipo durante la corrida.

Tabla 9. Programa GC cromatográfico para el análisis de BITC

<b>Temperatura del inyector</b>	250 °C
<b>División de flujo</b>	Split 20:1
<b>Flujo de gas (He)</b>	1,0 mL/min
<b>Columna</b>	VF-23ms
<b>Temperatura del horno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isotérmico a 45 °C por 4 minutos</li> <li>- Gradiente de 15 °C/min hasta 190 °C</li> <li>- Gradiente de 30 °C/min hasta 240 °C</li> <li>- Isotérmico a 240 °C por 2 minutos</li> </ul>

#### 4.2.4.2. Análisis de los metabolitos volátiles restantes en GC-MS

Para este análisis, se necesitó inyectar un gran volumen de muestra en el inyector multimodo (MMI) ya que los analitos se encontraron en baja concentración y son difíciles de concentrar por evaporación ya que son volátiles. Se utilizó el modo de “eliminación simple de solvente” que consistió en mantener el inyector a -5 °C utilizando nitrógeno líquido durante la aplicación de los 25  $\mu$ L de muestra. El flujo de helio que pasó a través del *liner* removió una cantidad de solvente (por evaporación) similar a la cantidad de líquido entrante que se depositó en la inyección<sup>26</sup>; de este modo, se concentró la muestra antes de entrar a la columna del GC. Las condiciones del método se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Programa GC cromatográfico para el análisis de compuestos bencilados

<b>Secuencia del inyector de temperatura programada (MMI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isotérmico a -5 °C por 3,27 minutos</li> <li>- Gradiente de 600 °C/min hasta 250 °C</li> <li>- Isotérmico a 250 °C por 2 minutos</li> </ul>
<b>División de flujo</b>	Eliminación selectiva de solvente
<b>Flujo de gas (He)</b>	1,0 mL/min
<b>Columna</b>	VF-23ms
<b>Temperatura del horno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isotérmico a 45 °C por 4 minutos</li> <li>- Gradiente de 15 °C/min hasta 190 °C</li> <li>- Gradiente de 30 °C/min hasta 240 °C</li> <li>- Isotérmico a 240 °C por 2 minutos</li> </ul>

#### 4.2.5. Extracción clorofórmica para el análisis de ácido benzoico

Para esta extracción, se utilizaron 0,5 g de peso seco de maca que se colocaron dentro de un tubo de vidrio con 10 mL de diclorometano acidificado (0,1% HCl<sub>(cc)</sub>). Luego, se agitó en un Vortex por 30 segundos y se colocó en un baño de ultrasonido a 30 °C por 1 hora. Inmediatamente, se pasó por la columna de sulfato de sodio y se recibió en un vial de 12 mL. El extracto se guardó a -20 °C hasta analizarlo.

##### 4.2.5.1. Concentración de muestra y derivatización de ácido benzoico

Para la derivatización, se siguió el método descrito en el manual de derivatizaciones para cromatografía<sup>27</sup>, pero con algunas modificaciones.

Se concentraron 2 mL de extracto utilizando un evaporador centrífugo en modo “vacío alcohólico” y a 30 °C por 20 minutos. Se tapó el vial de 2 mL, se agitó en un Vortex por 1 minuto y lo concentrado se trasvasó a un inserto de 250 µL. De nuevo, se usó el concentrador

en las mismas condiciones y esta vez, sí se evaporó a sequedad. Con una jeringa de 100  $\mu\text{L}$ , se lavó las paredes del inserto con 8 gotas de diclorometano. Se volvió a evaporar a sequedad, pero esta vez a 45  $^{\circ}\text{C}$  por 15 min y sin generar vacío. Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de MSTFA dentro del inserto, se tapó y dejó en un bloque termostatzado a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Luego, se dejó enfriar por 10 minutos y se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de diclorometano.

#### 4.2.5.2. Análisis de ácido benzoico

##### 4.2.5.2.1. Método en GC-MS

Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra derivatizada en el GC-MS equipado con una columna VF-23ms. En la Tabla 11, se muestran las condiciones del método de separación.

Tabla 11. Programa GC-MS cromatográfico para análisis de BCOOH

<b>Temperatura del inyector</b>	250 $^{\circ}\text{C}$
<b>División de flujo</b>	Split 10:1
<b>Flujo de gas (He)</b>	1,0 mL/min
<b>Temperatura del horno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isotérmico a 50 <math>^{\circ}\text{C}</math> por 1 minuto</li> <li>- Gradiente de 25 <math>^{\circ}\text{C}/\text{min}</math> hasta 175 <math>^{\circ}\text{C}</math></li> <li>- Gradiente de 4 <math>^{\circ}\text{C}/\text{min}</math> hasta 230 <math>^{\circ}\text{C}</math></li> <li>- Isotérmico a 230 <math>^{\circ}\text{C}</math> por 5 minutos</li> </ul>

##### 4.2.5.2.2. Método en GC-FID

Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra derivatizada en el GC-FID equipado con una columna DB-5. En la Tabla 12, se muestran las condiciones durante la corrida.

Tabla 12. Programa GC-FID cromatográfico para análisis de BCOOH

<b>Temperatura del inyector</b>	250 °C
<b>División de flujo</b>	Split 10:1
<b>Flujo de gas (He)</b>	1,0 mL/min
<b>Temperatura del horno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isotérmico a 50 °C por 4 minutos</li> <li>- Gradiente de 25 °C/min hasta 180 °C</li> <li>- Gradiente de 10 °C/min hasta 250 °C</li> <li>- Gradiente de 30 °C/min hasta 280 °C</li> <li>- Isotérmico a 280 °C por 5 minutos</li> </ul>



## **5. Resultados y discusión**

### **5.1. Análisis de metabolitos volátiles**

#### **5.1.1. Condiciones de los experimentos de secado**

En el laboratorio, se realizaron pruebas previas que compararon los secados de rodajas y de ralladuras, y el resultado de las cinéticas demostró que el secado de maca rallada produce mayor cantidad de macamidas. Otra prueba que se realizó fue secar a diferentes temperaturas: 25, 30 y 40 °C.<sup>28</sup> A partir de los resultados, se sugirió que 35 °C sería una temperatura óptima para el secado y la actividad enzimática ya que la actividad de la mirosinasa es estable hasta los 40 °C.<sup>29</sup> Por estas razones, se mantuvo la temperatura a 35 °C y el rallado de maca. El objetivo de estos experimentos es lograr el monitoreo de los volátiles en lapsos cortos de manera que nos ofrezcan una captura instantánea de estos. Para ello, se usó una recámara de vidrio de 600 mL, se creó una bandeja de malla metálica que pueda contener 10 g de ralladura de maca y se probaron diferentes flujos de aire para lograr un secado en horno de laboratorio en periodos cortos, pero suficientemente largos para que se den los procesos enzimáticos. Anteriormente, Esparza y colaboradores<sup>3</sup> reportaron perfiles cinéticos de secados de 24 horas de baja resolución. Por esta razón, inicialmente se quiso realizar secados que demoren más de 24 horas para obtener mejor resolución de los perfiles cinéticos ya que los procesos metabólicos de la postcosecha serían más lentos. El primer experimento de secado de maca se dejó dentro del sistema de secado por 48 horas; sin embargo, se decidió seguir el secado por 24 horas más ya que la muestra no se veía seca. A partir de esta observación, el periodo de secado de los experimentos fue 72 horas. Primero se probó el secado con un flujo de 20 mL/min y, a las 24 horas, se observó presencia de hongos. Se esperó cumplir con el periodo de 72 horas para pesar la muestra, meterla en el horno a 110 °C por una hora y pesarla nuevamente para obtener la humedad residual. Debido a la aparición de hongos, se empezó a desinfectar las macas antes de rallarla; sin

embargo, esto solo disminuyó la cantidad de hongos. Entonces, se aumentó el flujo a 30 mL/min y, en este caso, se observó presencia de hongos a las 48 horas de secado. Se volvió a aumentar el flujo a 40 mL/min y se logró eliminar la aparición de hongos ya que se evitó la condensación de agua en las paredes de la recámara. En la Tabla 13, se muestran los valores de la humedad residual de las muestras después de las 72 horas de secado en horno. Para los siguientes experimentos en donde se realizó el monitoreo continuo de metabolitos, la velocidad de flujo que se utilizó fue 40 mL/min para tener un recambio de aire total al interior de la recámara en un tiempo de 15 minutos, lo que nos permitía tener una resolución de ese tiempo en el muestreo de volátiles. Además, para asegurar que dentro de la recámara no haya condensación del vapor de agua y evitar la aparición de hongos que pudieran interferir en el metabolismo estudiado.

Tabla 13. Humedad residual de muestras de maca después de 72 horas de secado en horno. La humedad residual se calculó a partir de la diferencia entre la muestra después de 72 horas de secarlas a 35 °C y esa misma muestra secada a 110 °C. La aparición de hongos se eliminó al aumentar el flujo de aire ya que se evitó que el vapor de agua condense dentro de la recámara.

<b>Flujo de aire (mL/min)</b>	20	30	40
<b>Humedad residual (%)</b>	36.79	30.09	24.93
<b>Aparición de hongos</b>	Sí	Sí	No

### 5.1.2. Caracterización de compuestos

Para la caracterización de compuestos en el método de separación, se colocó 1 µL de cada estándar (benzaldehído, bencilalcohol, bencilnitrilo y bencilisotiocianato) en un papel filtro dentro de la recámara; después de una hora, se expusieron las fibras. Se identificaron los cuatro compuestos por el espectro de masas y usando la base de datos NIST 2011.

Luego, se hizo una prueba de la captura de volátiles durante el secado de maca en recámara. El sistema de cromatográfico mostró que los compuestos separan bien y que no hubo superposición de otros compuestos volátiles presentes en el secado de maca dentro de la recámara (Figura 10).

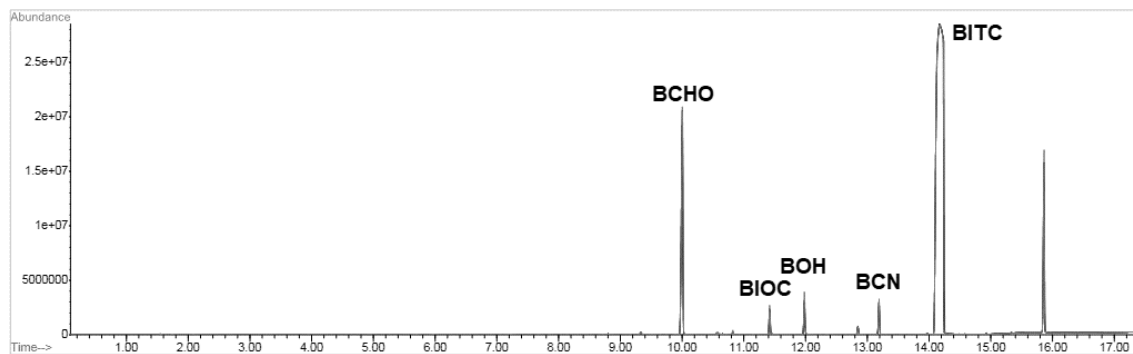


Figura 10. Perfil cromatográfico característico de GC de volátiles emitidos durante el secado de maca

### 5.1.3. Muestreo por HS-SPME

Se realizaron tres secados de maca bajo las mismas condiciones y las mediciones se realizaron por triplicado. En las 12 primeras horas de secado, el intervalo entre cada muestreo del espacio de cabeza por SPME es de una hora, este es el menor lapso entre muestreo que se pudo obtener ya que cada corrida en el GC duró 20 minutos y se realizaron tres mediciones por punto de la cinética. En las siguientes horas hasta la hora 72, el intervalo fue de cada dos horas. De este modo, se obtuvieron los perfiles de los metabolitos durante el secado de maca en horno (Figura 11); para poder promediar los secados, se calculó el porcentaje de área tomando al máximo valor de cada metabolito como 100%. En la Tabla 14, se presenta el promedio obtenido del máximo valor de cada metabolito en cada cinética; de este modo, se nota que BITC es el compuesto de mayor emisión ya que es uno o dos órdenes de magnitud mayor a los demás volátiles.

La primera medición se realiza después de cinco minutos de iniciar el rallado de maca ya que es el tiempo transcurrido entre rallar, pesar y exponer las fibras. En esta medición, se observa gran cantidad de BCN, BIOC y BITC, que disminuyen durante las primeras ocho horas. BCHO



aumenta durante las primeras seis horas y BOH aumenta durante las primeras 14 horas. Para poder interpretar los perfiles, también se debe de tener los perfiles de los demás metabolitos que se obtienen a partir de tres diferentes extracciones. Sin embargo, el seguimiento de los volátiles por el método de la sección 4.1.2 es cada una o dos horas, lo que nos brinda más información que las extracciones que se realiza el seguimiento cada 12 horas.

Tabla 14. Valores máximos obtenidos a partir del perfil cinético de cada compuesto. Se presenta el promedio del máximo valor de área (corriente total de iones) de cada compuesto y su respectivo error estándar (n= 9).

Compuesto	Máximo valor de área ( $\times 10^7$ )
BCHO	$34,89 \pm 12,17$
BIOC	$3,75 \pm 1,09$
BOH	$28,17 \pm 13,60$
BCN	$2,88 \pm 0,65$
BITC	$238,42 \pm 28,97$

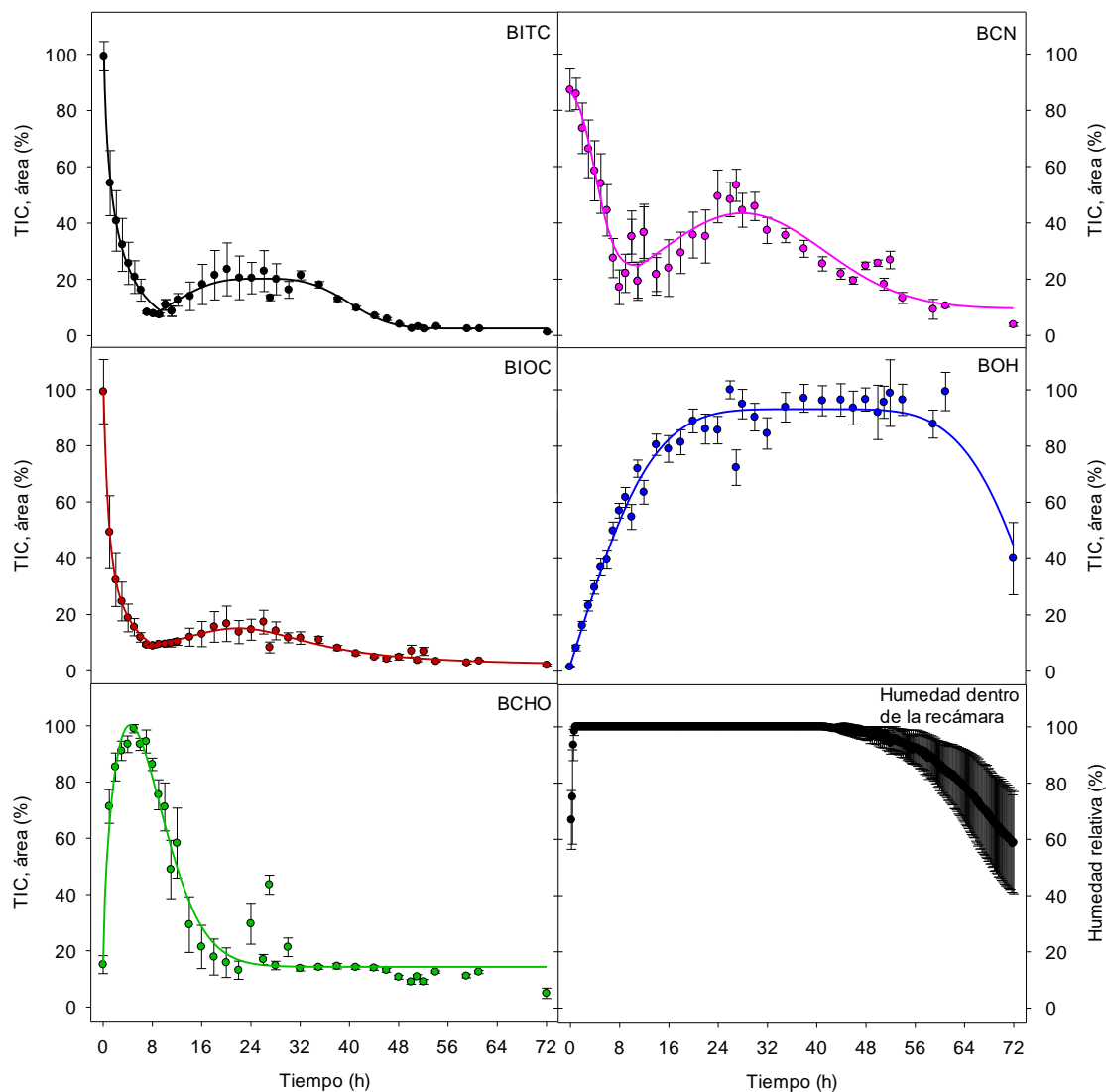


Figura 11. Perfil cinético de metabolitos volátiles emitidos durante el secado de maca a 35 °C. Cada punto de las curvas de metabolitos es un promedio del área del TIC (GC-MS) con su error estándar respectivo (n=9). En el caso de la humedad relativa, cada punto de la curva es un promedio de la humedad dentro de la recámara registrada por el sensor con su error estándar respectivo (n=3).

## 5.2. Análisis de metabolitos por extracción

Se tuvo que caracterizar nuevamente los volátiles ya que la extracción no solo extrae los compuestos volátiles sino otros compuestos que pueden interferir en la cuantificación. Además, se tuvo que caracterizar el ácido benzoico porque se analizó mediante un método nuevo.

Después de identificar los compuestos, se decidió eliminar la criomolienda para evitar que la muestra se descongele y humedezca durante el pesado de muestra de cada extracción. Para evitar los problemas mencionados, se pesaron las muestras en pequeños sobres de aluminio para los distintos métodos a ser aplicados y se guardaban en nitrógeno líquido hasta el día de la extracción.

### 5.2.1. Caracterización de compuestos bencilados

Se utilizó la inyección de volúmenes grandes de extracto (25-50  $\mu\text{L}$ ) utilizando un inyector de trampa programada de temperatura (PTV o MMI) para eliminación selectiva de solvente ya que volúmenes de 1  $\mu\text{L}$  no permitían la detección de los analitos. Previo a ello, se intentó concentrar la muestra utilizando dimetilsulfóxido para retener los volátiles en él, pero el tiempo de retención de este coincidía con la región de los analitos. Luego, se intentó reemplazar al dimetilsulfóxido por butanol, pero el problema de evaporar la mezcla de butanol y extracto clorofórmico con flujo de nitrógeno fue que la pérdida de butanol por evaporación no permitía cuantificar los metabolitos. Por ello, se optó por inyectar 25  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  en un MMI en modo "Eliminación de solvente". Durante la inyección de la muestra, se mantuvo el inyector a  $-5^{\circ}\text{C}$  por 3,27 minutos utilizando nitrógeno líquido para concentrar la muestra en el liner, después rápidamente se aumentó la temperatura hasta  $250^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo por dos minutos para asegurar la desorción de los compuestos (Tabla 10). Finalmente, el volumen de inyección del análisis de compuestos bencilados fue 25  $\mu\text{L}$  ya que se pudo observar los picos

correspondientes de cada compuesto y la inyección de 50  $\mu$ L se detectaban demasiados picos por concentración de impurezas.

Para eliminar las interferencias, se realizó la extracción de los tres iones mayoritarios de cada compuesto reportado por NIST. En la Tabla 15, se presentan los iones que se utilizaron para la cuantificación de los cinco metabolitos bencilados.

Tabla 15. Iones seleccionados para la cuantificación

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones seleccionados (m/z)		
BCHO	10.52	77	106	105
BIOC	11.78	133	91	105
BOH	12.48	79	108	107
BCN	13.60	117	90	116
BITC	14.33	91	149	65

### 5.2.2. Caracterización de ácido benzoico

En un extracto clorofórmico de maca derivatizado con MSTFA, se identificó el producto del ácido benzoico por la coincidencia del espectro de masas obtenido en el minuto 5,9 del programa cromatográfico (Tabla 11) con su espectro. Entonces, se derivatizó ácido benzoico y se comprobó que sí era. Sin embargo, se cambió de método cromatográfico ya que el pico del compuesto tenía cola. Por esta razón, se probó otra columna y se adaptó el método del GC-MS al GC-FID que estaba equipado con una columna DB-5. En la Figura 12, se muestran los cromatogramas superpuestos que aseguran una buena separación del ácido benzoico con los demás compuestos.

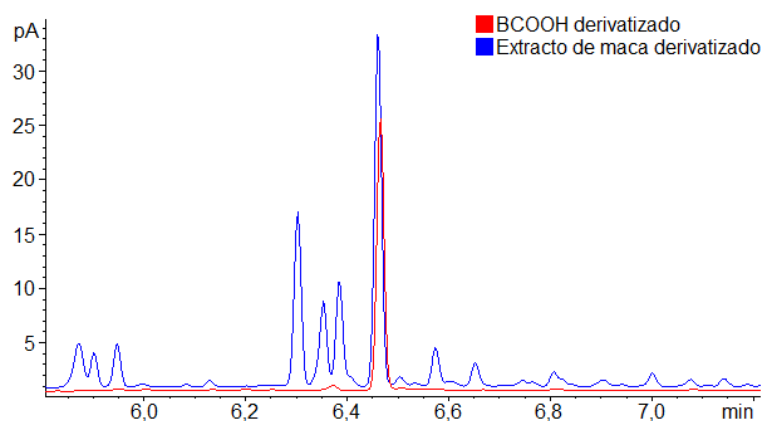


Figura 12. Superposición de cromatogramas de GC-FID de BCOOH. Se muestra que el tiempo de retención de la derivatización por MSTFA de BCOOH es 6,46 minutos y que no hay interferencia de otros compuestos presentes en la extracción clorofórmica de maca.

Además de este último cambio, se realizó la extracción con diclorometano acidificado para asegurarnos que el ácido benzoico esté protonado y se encuentre en la extracción. Para asegurar que es necesario acidificar el solvente, se realizaron las dos extracciones utilizando dos muestras de la misma maca y los resultados obtenidos fueron  $0.02 \pm 0.001 \mu\text{mol/g}$  de peso seco para la extracción sin acidificación y  $0.07 \pm 0.032 \mu\text{mol/g}$  de peso seco para la otra extracción. Con este resultado, podemos afirmar que es necesaria la acidificación del diclorometano.

### 5.2.3. Condiciones de los experimentos de secado

Se realizaron tres experimentos de secado de 72 horas emulando el secado en campo. A partir de los tres experimentos, se obtuvo el perfil de humedad residual (Figura 13) promediando los nueve valores de humedad residual de cada muestra secada a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  y calculando el error estándar. En medio del secado, entre las 24 y 48 horas, la pérdida de humedad es ligeramente más rápida que lo que se observa en el secado en campo entre los 18 y 36 días (Figura 7). Sin embargo, los secados en el laboratorio se asemejan al perfil de la pérdida de agua en el tejido.

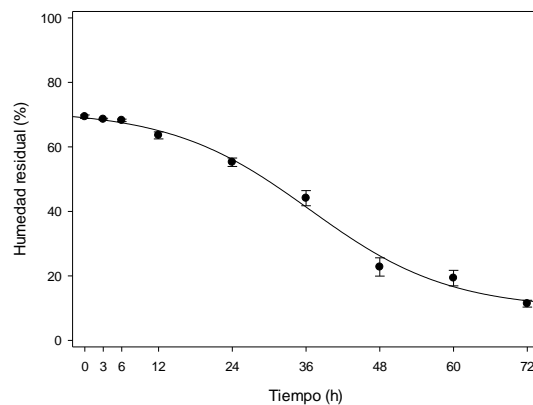


Figura 13. Perfil de humedad residual. Cada punto de la cinética es un promedio del cálculo de humedad residual con su respectivo error estándar (n=9).

#### 5.2.4. Muestreo de maca para las extracciones

En cada experimento, se retiró muestra para cada extracción por duplicado; es decir, se pesaron dos muestras de 0,5 g de peso seco para el análisis de BCOOH y cuatro muestras de 1 g de peso seco: dos para la extracción metanólica y dos para la extracción clorofórmica.

El muestreo se realizó con un periodo de 12 horas, salvo durante las primeras horas, en las que se incluyó una toma de muestra a las tres horas y otra a las seis horas con el fin de tener una mejor resolución en esta etapa del secado. Esto debido a que se observó que algunos compuestos presentaban perfiles cinéticos con variaciones muy rápidas (ver Figura 11).

Se realizó el análisis y la cuantificación de cada analito en  $\mu\text{mol}$  utilizando curvas de calibración. Para normalizar los valores sin el contenido de agua en el tejido, se dividió la cantidad de moles por el peso seco. A partir de los tres secados, se promediaron los valores de cada punto de la cinética y los valores máximos promedio de cada compuesto se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores máximos de acumulación obtenidos a partir de la curva graficada para cada compuesto, después de promediar los valores en  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco ( $n= 6$ ), en cada tiempo, en las tres cinéticas realizadas.

<b>Acumulación máxima</b> ( $\mu\text{mol/g}$ de peso seco)	
<b>BGL</b>	21,18 $\pm$ 2,05
<b>BITC</b>	11,92 $\pm$ 3,71
<b>BNH2</b>	19,51 $\pm$ 3,14
<b>BIOC</b>	0,018 $\pm$ 0.004
<b>BCN</b>	0,033 $\pm$ 0,004
<b>BCHO</b>	0,062 $\pm$ 0,004
<b>BOH</b>	0,158 $\pm$ 0,014
<b>BCOOH</b>	0,299 $\pm$ 0,076
<b>FFA</b>	1,829 $\pm$ 0,282
<b>MAC</b>	0,147 $\pm$ 0,023

Se observó que los valores iniciales de BGL de cada lote de maca eran distintos. Por esta razón, se transformaron los valores cuantificados en porcentaje de abundancia molar para poder comparar las tres cinéticas y ver los perfiles claramente. Para esta conversión, se usó al mayor valor de las seis muestras (dos por cada experimento) como el 100% y, con este, se calcularon los demás porcentajes de abundancia molar. Luego, se graficaron en función del tiempo de secado para obtener los perfiles cinéticos. Se utilizó la función “*Regression Wizard*” de SigmaPlot para graficar la curva que mejor se ajusta a los puntos de la gráfica en cada caso (Figura 14) y se calcularon los coeficientes de Pearson entre cada una de ellas (Tabla 17).

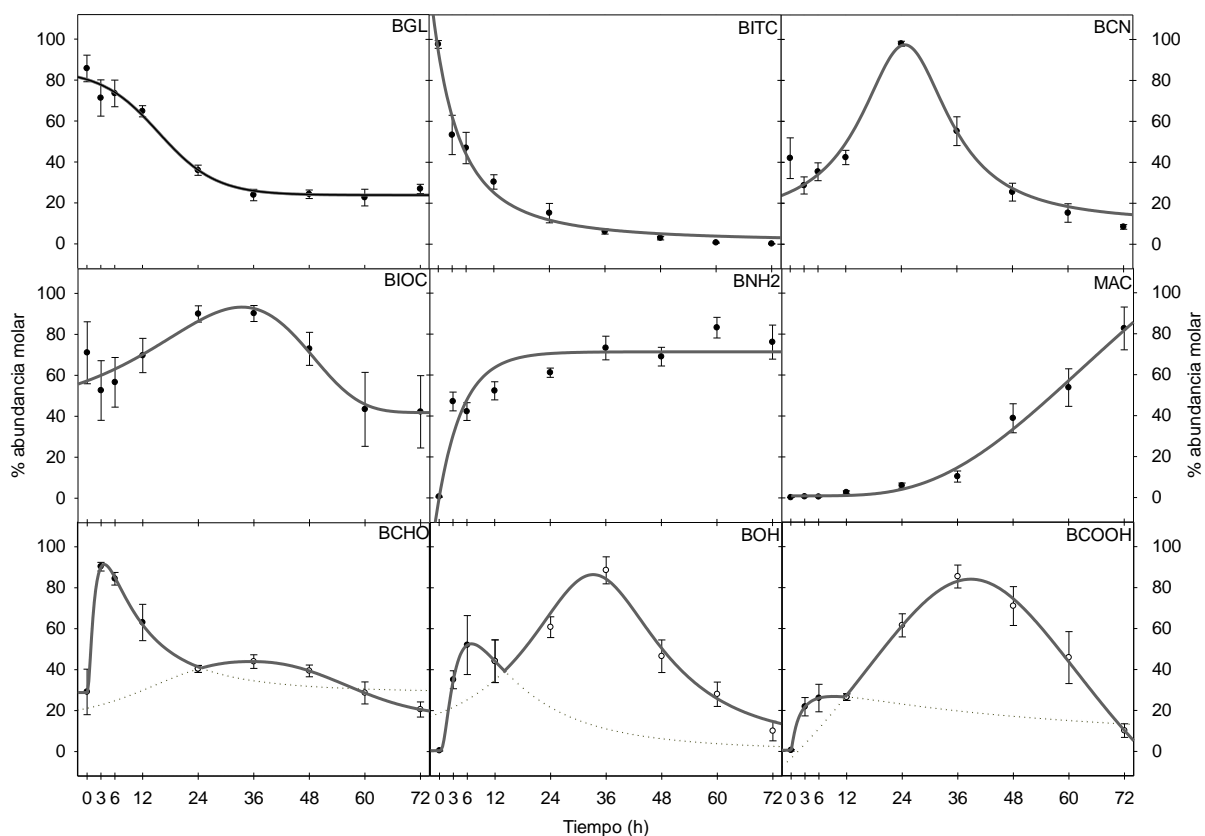


Figura 14. Perfil cinético de metabolitos durante el secado de maca. Cada punto de las curvas es un promedio de los resultados obtenidos con su respectivo error estándar ( $n=6$ )

Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson de los metabolitos. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre todos los metabolitos; sin embargo, solo se presentan los que tiene valores de  $P < 0,050$  ( $n = 6$ ).

	BGL	MAC	BCN	BITC	BCOOH
BNH2	-0,899			-0,978	
BGL				0,932	
FFA		0,952			
BIOC			0,837		
BOH					0,836

A partir de la información extraída de los perfiles de volátiles obtenidas por SPME, se puede entender que el rallado provoca una primera liberación de compuestos volátiles, en especial



BITC, producto de la ruptura celular debido al daño mecánico producido. Por otro lado, las extracciones del material nos muestran los productos residuales y reacciones más lentas que se producen no solo debido al daño inicial, sino también las generadas por el secado subsiguiente.

Por estudios previos, se conocen los productos de la hidrólisis de glucosinolatos. Halkier y Gershenzon reportan que el glucosinolato se degrada en glucosa y una aglicona inestable por acción catalítica de la mirosinasa y que se pueden formar isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos dependiendo de la cadena lateral y los cofactores presentes. Sin embargo, se conoce que los productos más comunes en varias especies son los isotiocianatos.<sup>18</sup> Gimsing y colaboradores realizaron un estudio de la hidrólisis de BGL en suelos, y observaron que los productos de la hidrólisis dependen del entorno. Ellos encontraron que la formación de BCN se favorece en condiciones ácidas (pH bajo) y en presencia de  $Fe^{2+}$ ; y que este no se favorece en condiciones neutras, pero sí a la formación de BITC.<sup>30</sup> Por otro lado, en un estudio de secado la maca, Esparza y colaboradores<sup>3</sup> reportaron sobre productos volátiles de la hidrólisis de BGL y observaron que BITC se encuentra en varios órdenes mayores de magnitud que otros productos hidrolíticos primarios y se puede especular a partir de esto que el producto mayoritario de esta reacción es el BITC. Esto concuerda con lo que se reporta en este trabajo, ya que sus valores máximos (emitido y residual), mostrados en las Tabla 14 y Tabla 16, son al menos dos órdenes de magnitud mayor que BIOC y BCN.

La reacción de formación de BITC debido al rallado es muy rápida y no se pudo registrar de manera adecuada ya que el tiempo de captura de BITC por SPME tiene resolución de una hora que no permite ver claramente este primer paso, no se pudo acortar el tiempo ya que cada análisis en el GC demoró aproximadamente 20 minutos y cada punto de la cinética se realizó por triplicado. Alrededor de las 24 horas de secado, se nota un pulso en su perfil de emisión que corresponde al daño generado por el lento secado en horno (Figura 11); sin embargo, este pulso no se nota en el perfil residual debido a que la resolución de muestreo en SPME es mayor que la de extracción y en lapsos de doce horas no es posible ver las

diferencias mínimas que se notan en lapsos de dos horas. En el caso de BIOC y BCN, la mayoría de lo formado se emite al espacio de cabeza y poco de estos compuestos se acumula en el material que va secando. Al comparar los valores de los tres metabolitos mencionados anteriormente y de BNH<sub>2</sub>, es evidente que el precursor de BNH<sub>2</sub> es BITC ya que se encuentran en el mismo orden de magnitud y sus perfiles son inversos (coeficiente de Pearson: -0,978). Es posible que BIOC sea un intermediario poco estable entre BITC y BNH<sub>2</sub>; sin embargo, es más probable que siga una ruta paralela, pero muy poco favorecida que intercambie el azufre por oxígeno del BITC.

Otro producto de oxidación de BITC es el BCHO.<sup>20</sup> Se puede observar en el perfil de BCHO, tanto emitido como residual, un pico alrededor de las seis primeras horas de secado. Esto implica que la formación de BCHO se da durante estas seis primeras horas, con un máximo a las tres horas, y su descenso puede estar reaccionando a la formación de otros compuestos. Observando los perfiles de BOH y BCOOH que son similares (coeficiente de Pearson: 0,836) y que siguen una cinética paralela; de manera que, ambos se producirían a partir del BCHO bajo reacciones simultáneas y complementarias. Una reduce directamente al BCHO en BOH; mientras que, para que se forme BCOOH, es necesario que BCHO entre en equilibrio con su forma hidratada, fenilmetanodiol, que será quien permita la formación de la especie oxidada. De esta forma, se pueden producir estas dos reacciones simultáneamente y que además comparten cofactores. Este modelo de reacción tipo Cannizzaro biocatalizada ha sido propuesta para reacciones mediadas por benzaldehído deshidrogenasas (Figura 6).<sup>25</sup> Además, se propuso que la disminución de producción de BCOOH en la segunda mitad del secado es por la poca presencia de agua en el medio; de este modo, disminuye la formación del fenilmetanodiol, ya que disminuye el transporte de hidroxilos que puedan reaccionar con BCHO. Widhalm y Dudareva reportan las reacciones que permiten el almacenamiento de BCOOH en la vacuola; estas incluyen la glucosilación, metilación, conjugación con aminoácidos e hidroxilación.<sup>31</sup> En esta tesis, se observa un incremento inicial marcado durante el secado en la concentración de BCOOH libre en los tejidos, seguida de su

desaparición a medida que avanza el proceso. Los experimentos con hidrólisis de las muestras indican que es posible que este compuesto haya reaccionado con alcoholes para formar ésteres o con azúcares para formar derivados glicosilados. De este modo, el equilibrio de BCHO se desplazaría hacia la formación de fenilmetanodiol para recuperar el equilibrio y disminuiría la formación de BOH; esto explicaría por qué BCOOH y BOH disminuyen al mismo tiempo, y que el máximo valor de BCOOH (0,3  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco) sea mayor que el de BOH (0,16  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco).

Sobre la base de lo discutido anteriormente, se propuso la siguiente biosíntesis de BCOOH y otros metabolitos (Figura 15).



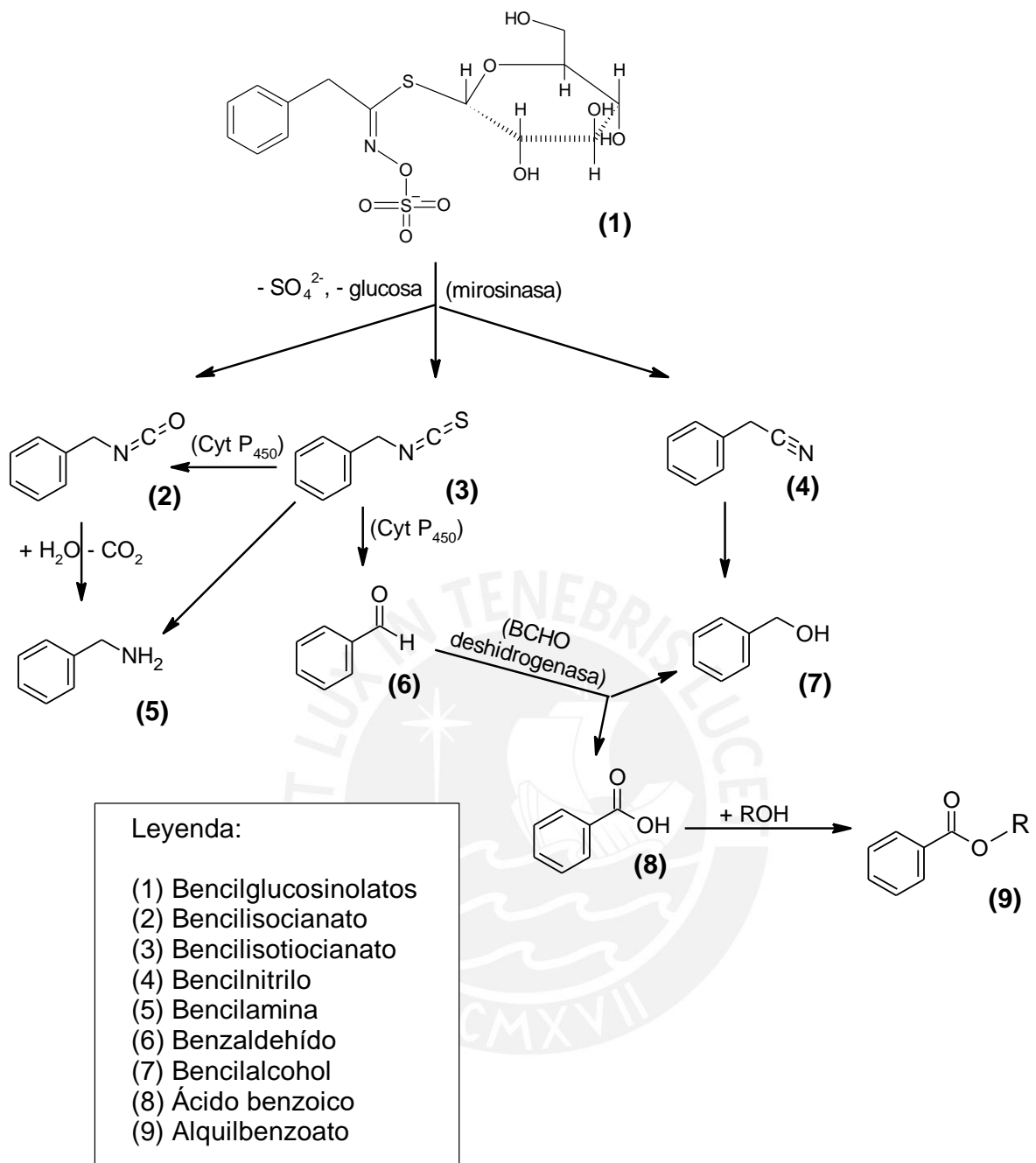


Figura 15. Propuesta de la biosíntesis del ácido benzoico y otros metabolitos bencilados en maca bajo condiciones de secado.

## 6. Conclusiones

Se logró secar maca bajo condiciones controladas, en horno de laboratorio, durante un periodo de 72 horas en un proceso que emula adecuadamente el secado en campo con una pérdida gradual de agua y de actividades enzimáticas en los tejidos. De esta manera, se obtuvo una cinética más lenta que en trabajos anteriores y se obtuvieron más puntos de muestreo que permitieron una mejor definición del perfil de intermediarios representativos de la hidrólisis de glucosinolatos durante el secado. Al realizar el seguimiento de los volátiles por SPME, se observó que gran cantidad de los metabolitos involucrados en la primera fase de la ruta metabólica de la hidrólisis del bencilglucosinolato, se pierden por volatilización al inicio del secado y esto se debe al daño celular inicial generado por el rallado mecánico. Posteriormente se observa un segundo pulso de productos hidrolíticos, más lento que el primero, que se genera por el proceso de secado de los tejidos en sí.

Se cuantificó también los metabolitos volátiles y ácido benzoico por extracción directa y cromatografía líquida. Esto permitió relacionar los metabolitos de manera estequiométrica e identificarlos como productos terminales o especies intermedias. Debido a que se logró un secado lento, se pudo obtener más información de los perfiles cinéticos de benzaldehído y bencilalcohol; se reportó también por primera vez el perfil del ácido benzoico durante el proceso y se propuso que su precursor es benzaldehído (Figura 15). Por otro lado, su perfil demuestra que no es un producto terminal ya que solo muestra presencia transitoria con posterior acumulación de ésteres de este compuesto, los cuales son típicos productos de detoxificación en plantas.

## 7. Bibliografía

1. Esparza, E., Hadzich, A. & Cosio, E. La maca: la química detrás de su secado tradicional. *Rev. Química PUCP* **29**, 11–17 (2015).
2. Quirós, C. & Aliaga Cárdenas, R. *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 21. (International Plant Genetic Resources Institute, 1997).
3. Esparza, E., Hadzich, A., Kofer, W., Mithöfer, A. & Cosio, E. G. Bioactive Maca (*Lepidium meyenii*) alkalamides are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry* **116**, 138–148 (2015).
4. Gonzales, G. F. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the Peruvian highlands. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2012**, 1–10 (2012).
5. Esparza, E. Metodología para el análisis rápido de metabolitos secundarios bioactivos de maca (*Lepidium meyenii*, Walpers). (PUCP, 2010).
6. Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior. Ficha Comercial 110620 HARINA, SÉMOLA Y POLVO DE SAGÚ Y DE RAÍCES DE MANDIOCA YUCA, ARRURRUZ, SALEP, AGUATURMAS PATACAS, BATATAS BONIATOS, CAMOTES Y TUBÉRCULOS SIMIL. RICOS EN FÉCULA O EN INULINA DE LA PARTIDA 0714. *Ministerio de Comercio Exterior y Turismo* (2017). Disponible en: [http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?\\_page\\_=172.17100#anclafecha](http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=172.17100#anclafecha). (Acceso: 22 de abril de 2018)
7. Tapia, M. E. & Fries, A. M. *Guía de campo de los cultivos andinos*. FAO; ANPE-Perú (2007).
8. Wirthensohn, M. G., Chin, W. L., Franks, T. K., Baldock, G., Ford, C. M. & Sedgley, M. Characterising the flavour phenotypes of almond (*Prunus dulcis* Mill.) kernels. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **83**, 462–468 (2008).
9. Saad, B., Bari, M. F., Saleh, M. I., Ahmad, K. & Talib, M. K. M. Simultaneous

- determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1073**, 393–397 (2005).
10. Hadzich Girola, A. Metabolismo post-cosecha de maca (*Lepidium meyenii*, Walpers) durante su secado tradicional e industrial, con énfasis en la formación de amidas. *Pontificia Universidad Católica Del Perú* (Pontificia Universidad Católica Del Perú, 2017).
  11. ECOANDINO. Maca products. *ECOANDINO* (2018). Disponible en: <http://ecoandino.com/products/maca/>. (Acceso: 23 de abril de 2018)
  12. Dini, A., Migliuolo, G., Rastrelli, L., Saturnino, P. & Schettino, O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chem.* **49**, 347–349 (1994).
  13. Li, G., Ammermann, U. & Quirós, C. F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Econ. Bot.* **55**, 255–262 (2001).
  14. Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., de Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R. & Dekker, M. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 219–265 (2009).
  15. Pino-Figueroa, A., Vu, H., Kelley, C. J. & Maher, T. J. Mechanism of Action of *Lepidium meyenii* (Maca): An Explanation for Its Neuroprotective Activity. *Am. J. Neuroprot. Neuroregen.* **3**, 87–92 (2011).
  16. benzyl alcohol, 100-51-6. *The Good Scents Company Information System*. Disponible en: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1001652.html>. (Acceso: 25 de noviembre de 2019)
  17. Chen, J.-J., Gong, P.-F., Liu, Y.-L., Liu, B.-Y., Eggert, D., Guo, Y.-H., Zhao, M.-X., Zhao, Q.-S. & Zhao, B. Postharvest Ultrasound-Assisted Freeze-Thaw Pretreatment Improves the Drying Efficiency, Physicochemical Properties, and Macamide Biosynthesis of Maca (*Lepidium meyenii*). *J. Food Sci.* **0**, 1–9 (2018).

18. Halkier, B. A. & Gershenzon, J. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 303–333 (2006).
19. Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. & Meijer, J. Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* **42**, 93–113 (2000).
20. Goosen, T. C., Mills, D. E. & Hollenberg, P. F. Effects of benzyl isothiocyanate on rat and human cytochromes P450: identification of metabolites formed by P450 2B1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 198–206 (2001).
21. Benzoic Acid Sample. *The Functional Nutrition Library*. Disponible en: <https://www.functionalnutritionlibrary.com/benzoic-acid-sample/>. (Acceso: 19 de diciembre de 2019)
22. Mao, X., Yang, Q., Chen, D., Yu, B. & He, J. Benzoic acid used as food and feed additives can regulate gut functions. *Biomed Res. Int.* **2019**, 6 (2019).
23. Mutlib, A. E., Dickenson, P., Chen, S. Y., Espina, R. J., Daniels, J. S. & Gan, L. S. Bioactivation of benzylamine to reactive intermediates in rodents: Formation of glutathione, glutamate, and peptide conjugates. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1190–1207 (2002).
24. Swain, C. G., Powell, A. L., Sheppard, W. A. & Morgan, C. R. Mechanism of the Cannizzaro Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3576–3583 (1979).
25. Wuensch, C., Lechner, H., Glueck, S. M., Zangger, K., Hall, M. & Faber, K. Asymmetric biocatalytic cannizzaro-type reaction. *ChemCatChem* **5**, 1744–1748 (2013).
26. *Agilent Multimode Inlet Large Volume Injection Tutorial*. (2009).
27. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. (John Wiley & Sons Ltd, 1993).
28. Ríos Zuñiga, A. Z. Metabolismo de ácidos grasos en Maca (*Lepidium meyenii*) durante el secado en horno. *Pontificia Universidad Católica del Perú* (PUCP, 2018).
29. Chen, J. jin, Zhao, Q. sheng, Liu, Y. lan, Gong, P. fei, Cao, L. li, Wang, X. dong & Zhao, B. Macamides present in the commercial maca (*Lepidium meyenii*) products



- and the macamide biosynthesis affected by postharvest conditions. *Int. J. Food Prop.* **20**, 3112–3123 (2017).
30. Gimsing, A. L., Poulsen, J. L., Pedersen, H. L. & Hansen, H. C. B. Formation and degradation kinetics of the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4271–4276 (2007).
31. Widhalm, J. R. & Dudareva, N. A familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic acids. *Mol. Plant* **8**, 83–97 (2015).

