

# EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE MACAMIDAS EN TRES ECOTIPOS DE *LEPIDIUM MEYENII* (MACA), CULTIVADAS Y SECADAS EN LA LOCALIDAD DE CERRO DE PASCO-JUNÍN

EVALUATION OF MACAMIDES IN THREE ECOTYPES OF *LEPIDIUM MEYENII* (MACA), CULTIVATED AND DRIED IN THE LOCALITY OF CERRO DE PASCO-JUNÍN.

Julitza Paredes Fuentes,<sup>1,2</sup> Mocita De la Fuente Torres,<sup>2</sup> José Carpio Carpio,<sup>2</sup> Karin Vera Lopez,<sup>2</sup> Benjamín Paz Aliaga,<sup>2</sup> José Villanueva Salas.<sup>1,2</sup>

(1) Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio,

(2) Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María – Arequipa

**RESUMEN:** *Lepidium meyenii* (Maca) es un recurso vegetal oriundo de los andes centrales del Perú que ha alcanzado relevancia internacional debido a sus propiedades medicinales que se le atribuyen. Es así que dentro de los principales componentes activos que presenta, se encuentran las macamidas, amidas secundarias formadas por bencilamina y un resto de ácido graso, con longitudes de cadena y grado de insaturación variables<sup>2</sup>. En el presente trabajo se identificó y cuantificó por HPLC-DAD, N-(3-metoxibenzil)-tetradecanamida(1), N-benzilhexadecanamida(2), N-(3-metoxibenzil)-hexadecanamida(3), N-benziloctadecanamida(5), N-benziltetradecanamida(11); presentes en los extractos pentánicos obtenidos por re-extracción continua líquido-líquido de extractos metanólicos de los ecotipos amarilla, negra y roja. Para lo cual se requirió un proceso de adecuación y estandarización de la técnica analítica cromatográfica usando una fase estacionaria C-18 y una fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua acidificada en gradiente, a una temperatura de 30°C y un flujo de 0.5 mL/min, alcanzando un LOD y LOQ entre 0.10 y 0.64 µg/mL y un porcentaje de recuperación entre 80.91% - 101.26%. Las concentraciones halladas estuvieron en un rango entre 35.57 y 0.075 mg/g de hipocótilos de maca seca. Siendo el ecotipo amarillo el que presentó la mayor cantidad de estas macamidas.

**Palabras clave:** *Lepidium meyenii*, macamidas, ecotipos.

**ABSTRACT:** *Lepidium meyenii* (Maca) is a native resource of the central Andes of Peru that has achieved international importance due to its medicinal properties. The main active components presents in this plant are the macamides, secondary amides formed by benzylamine and a rest of fatty acid, with variable lengths of chain and degree of unsaturation. In the present work were identified and quantified by HPLC-DAD, N-(3-metoxibenzil)-tetradecanamide(1), N-benzylhexadecanamide(2), N-(3-metoxibenzil)-hexadecanamide(3), N-benzyl-octadecanamide(5), N-benzyl-tetradecanamide(11); present in the pentanic extracts obtained by liquid-liquid continuous partition of methanolic extracts of yellow, black and red ecotypes. It was required a process of adaptation and standardization of the chromatographic analytical technique using a stationary C-18 and a mobile phase composed of acetonitrile and water acidified applied in gradient, at a temperature of 30° C and a flow of 0.5 mL/min., reaching a LOD and LOQ between 0.10 and 0.64 µg/mL and a percentage of recovery between 80.91% - 101.26%. Macamides found concentrations were in the range between 35.57 y 0.075 mg/g of dry maca. Being yellow ecotype that presented the highest amount of these macamides.

**Keywords:** *Lepidium meyenii*, macamides, ecotypes.

## INTRODUCCIÓN

*Lepidium meyenii* conocida como Maca o Ginseng peruano, se le ha descrito como una planta herbácea que pertenece al género *Lepidium* y a la familia *Brassicaceae* y es considerada como la planta peruana con un alto potencial de bioprospección<sup>2,4,11,10</sup>.

El enfoque está en su raíz tuberosa que fue domesticada en la época Pre-inca, por sus múltiples usos nutricionales y terapéuticos, entre los efectos beneficiosos destacan la actividad neuroprotectora, estimulante del sistema nervioso central (actuando como antidepresivo, disminuye la ansiedad y analgésico), anti-proliferativa en el cáncer de próstata, también demostró proteger las células contra el estrés oxidativo<sup>4</sup>,

antifatiga, anti-osteoporosis, mejora la función sexual y mejora la fertilidad<sup>6,7,10</sup>.

Crece entre los 3000 a 4000 metros de altitud en diferentes partes de la sierra peruana, tradicionalmente en las regiones de Junín y Pasco y se han descrito 13 ecotipos de Maca de acuerdo a el color de sus hipocótilos lo cual está influenciado por los factores ambientales (el entorno de siembra, incluida la altitud, clima y fertilidad del suelo y el mismo proceso de secado)<sup>2</sup> que no solo puede causar cambios en el color de la raíz de Maca sino que va a causar variaciones en la composición de la Maca, por lo que se vio por conveniente identificar y cuantificar la presencia de 5 macamidas en 3 ecotipos de maca cultivados y secados en la región Junín.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal:** Los hipocótilos secos de las variedades negra, roja y amarilla de *Lepidium meyenii* fueron

Correspondencia:

Julitza Paredes Fuentes

E-mail: lindsey29\_07@hotmail.com

obtenidos en la localidad de Cerro de Pasco, provincia de Junín y colectados en el mes de octubre del 2015

**Solventes y reactivos:** acetonitrilo y metanol de calidad HPLC (Merck peruana), mientras que el ácido trifluoroacético (TFA) y n-pentano, grado P.A. (Merck peruana). Los estándares de macamidas utilizados *N*-(3-metoxibenzil)-tetradecanamida (1), *N*-benzylhexadecanamida (2), *N*-(3-metoxibenzil)-hexadecanamida (3), *N*-benzyl-octadecanamida (5), *N*-benzyltetracosanamida (11) fueron proporcionados por el Laboratorio de Farmacología del MCPHS University de Boston, USA.

**Método de extracción:** la obtención de los extractos pentánicos, se realizó en dos etapas. En la primera etapa se obtuvo el extracto metanólico por el método de Soxhlet a partir de 50 g de los hipocótilos triturados.

Una vez obtenidos los extractos metanólicos de maca, se inició con la segunda etapa, la re-extracción continua líquido-líquido con n-pentano por un tiempo de 9 horas. Una vez terminada la re-extracción, se procedió a evaporar el solvente orgánico, de esta manera se obtuvieron los extractos secos y se calculó los porcentajes de rendimiento.

**Análisis cuantitativo,** el ensayo se realizó en un sistema HPLC HITACHI Primaide, equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío en línea, un inyector automático, un detector de arreglo de diodos y un horno de columna.

La separación cromatográfica adecuada de macamidas en los extractos pentánicos de hipocótilos de Maca se obtuvo en una columna Thermo Scientific, Hypersil Gold C18 (250x4mm, 5 $\mu$ ) utilizando como Fase móvil A (acetonitrilo) y Fase móvil B (solución acuosa de TFA 0.005%) en un programa de elución en gradiente: 0 a 24 min, 80% a 100% de A., seguido de 24 a 32 min 100% de A y finalmente de 34 a 40 min 80% y 20%, con un flujo de 0,5 mL/min.

La longitud de onda se ajustó a 210 nm y la temperatura se ajustó a 30 °C. Una vez encontradas las condiciones cromatográficas adecuadas se procedió a la estandarización del método se llevó a cabo en función de la regresión lineal, la sensibilidad, la repetibilidad y la recuperación.

La calibración se llevó a cabo a partir de soluciones stock de 200  $\mu$ g/mL de cada macamida en metanol, a partir de ellas se prepararon diluciones en un rango de concentraciones de 0.25 a 50  $\mu$ g/mL.

La cuantificación de las macamidas en cada uno de los extractos, fueron expresados en  $\mu$ g/g de maca seca. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado y los resultados son expresados en el valor promedio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sabiendo que las macamidas son un grupo de compuestos apolares presentes únicamente en *Lepidium meyenii*, es que se vio por conveniente obtener la fase apolar del extracto metanólico entero.

Una vez terminada la extracción se procedió a evaporar el solvente no polar, obteniendo un rendimiento de 1.68%, 1.72% y 2.01% para el ecotipo de maca negra, roja y amarilla respectivamente (Figura 1).

Los extractos obtenidos presentaron un color café oscuro intenso, textura/ consistencia pegajosa y un olor *sui generis*.



Fig. 1. Hipocótilos de *Lepidium meyenii* de cada variedad

Para la determinación de la presencia de *N*-(3-metoxibenzil) tetradecanamida (1), *N*-benzylhexadecanamida (2), *N*-(3-metoxibenzil) hexadecanamida (3), *N*-benzyl-octadecanamida (5), *N*-benzyltetracosanamida (11), en los extractos obtenidos, se desarrolló un método donde se pudo separar e identificar a las macamidas analizadas en los tiempos de retención (Figura 2) que se mencionan en la Tabla 1.

Así mismo, las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y los rangos de curvas de calibración para los compuestos analizados se muestran en la Tabla 1. Todas las curvas de calibración mostraron una buena regresión lineal ( $R^2 > 0.990$ ) dentro de los rangos de prueba. Los LOD (límite de detección,  $S/N = 3$ ) y LOQ (límite de cuantificación,  $S/N = 10$ ) para los 5 compuestos investigados estuvieron en el rango de 0.1 – 0.27  $\mu$ g/mL y 0.11 a 0.64  $\mu$ g/mL, respectivamente. Las macamidas que tuvieron un menor LOD fueron la macamida (1) y (11), aquellas que tienen el tiempo de retención a los extremos de la corrida a diferencia de la *N*-benzil hexadecanamida que tiene un valor mayor de LOD mayor incluso al primer estándar medido, sin embargo, como los valores obtenidos en las corridas son muy superiores al primer estándar, no afecta a los datos expresados.

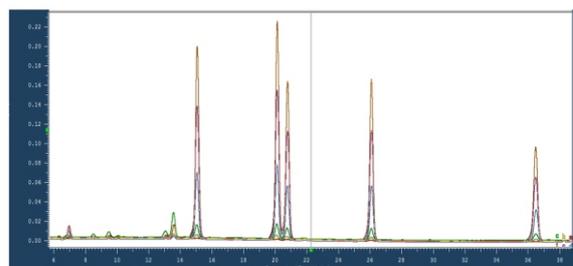


Fig. 2. Cromatograma de los estándares de macamidas obtenidos

Tabla 1. Evaluación de la linealidad en un rango de 0.5 a 50  $\mu$ g/mL

Código	Estándares				
	(1)	(3)	(2)	(5)	(11)
Tiempo de retención (min)	15.06	20.10	20.77	26.08	36.48
Estándar ( $\mu$ g/mL)	Área				
0.25	4816.8	4972.0	5051.6	6000.0	2791.0
1.0	26276.6	29282.8	22626.5	25679.0	14361.3
4.0	109023.5	103359.8	86908.6	94213.5	54866.5
16.0	476961.8	469795.6	383466.0	386346.7	259961.8
32.0	969922.8	959283.3	760614.6	801517.3	522691.5
50.0	1419222.4	1375194.2	1111394.4	1176049.5	744018.5
$R^2$	0.9983	0.9971	0.9981	0.9986	0.9963
b	3931.33	6573.10	6334.26	4489.38	4016.60
a	28887.51	28110.88	22586.50	23853.46	15250.27

Para el análisis de la variabilidad de las respuestas obtenidas se utilizó el coeficiente de variación (CV) se obtuvieron valores máximos de 4.097% para la concentración más baja trabajada para el estándar (11) y (1); mientras que el resto está por debajo de 2%. Mientras que las precisiones intermedias tuvieron valores entre 0.09% hasta 9.59%.

Siendo el último parámetro en ser evaluado la exactitud, donde se contaminó la muestra con una concentración de 1 µg/mL de cada estándar, obteniendo porcentajes de recuperación para cada macamida analizada en un rango de 80.91 a 101.26 %.

Finalmente, la evaluación de los extractos, mostró la ausencia de la macamida (1) en las tres variedades, adicionalmente, el contenido del resto de las macamidas analizadas fue menor en la maca negra y roja frente al de la maca amarilla. Cabe mencionar que la macamida más abundante fue la *N*-benzylhexadecanamide(2).

En el extracto de maca amarilla se encontró mayor proporción del resto de macamidas analizadas, siendo la *N*-benzylhexadecanamide(2) la más abundante detectándose 35.57 ± 1.8 mg/100 g de maca, seguida de la maca roja con 30 ± 0.46 mg/100 g de hipocótilos secos y finalmente 15 ± 0.19 mg/100 g de maca negra. La *N*-benzyl octadecanamide(5) está presente en concentraciones de 0.90 a 1.63 mg/100 de maca. Respecto a las macamidas restantes se encontraron concentraciones inferiores a 0.78 mg/100g de hipocótilos secos.

En el trabajo realizado por McCollom (2005) se demuestra que en todos los extractos preparados, la *N*-benzylhexadecanamide, fue la macamida predominante, sin embargo, al comparar las diferentes muestras de harina obtenidos de diferentes proveedores, encontró que hubo una diferencia en el patrón de macamida<sup>9</sup>. Así mismo Esparza (2015) encontró 629 ± 97 µg/g de macamidas totales en hipocótilos secos de maca<sup>2</sup>, valores cercanos a los nuestros, donde la macamida más abundante es de 355.7 µg/g de hipocótilos secos de maca amarilla. Por otro lado, Ganzera (2002), en su estudio analizó nueve productos comerciales de Maca expandidas en los supermercados de Mississippi and California, donde la macamida dominante fue la *N*-benzyl hexadecanamide (0,05 a 0,46%); la *N*-metoxibenzyl octadecadienamide solo estuvo presente en cantidades menores (0.01 a 0.06%)<sup>11</sup>.

## CONCLUSIONES

Se estandarizó el método analítico por HPLC para la determinación de macamidas, encontrándose que la separación fue posible usando una fase estacionaria C-18 Thermo Scientific, Hypersil Gold (250x4mm, 5µ) con una fase móvil más adecuada fue de Acetonitrilo (A) y agua-TFA 0.005% (B), usando una gradiente 80:20 (A:B) de 0 a 24 minutos, luego de 100:0 (A:B) hasta los 32 minutos, a un flujo de 0.5 mL/min. De los parámetros evaluados se puede concluir que el método presentó una linealidad aceptable para el rango de concentración de 0.25 a 50 µg/mL, sensible, lo suficientemente preciso, y con recuperación global entre 80.91% - 101.26%.

Se logró identificar y cuantificar cuatro macamidas en tres variedades de *Lepidium meyenii* (Maca), en función de los

estándares disponibles, siendo la *n*-benzylhexadecanamide (2) la más abundante, detectándose 35.57 ± 1.8 mg/g de hipocótilos secos de maca amarilla y de las macamidas restantes se encontraron concentraciones inferiores a 1.63 mg/g de maca.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Farmacología del *Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) que financió esta tesis mediante el proyecto CONV-000085-2014-FONDECYT-DE.

## REFERENCIAS

- [1]. Yábar, E.; Pedreschi, R.; Chirinos R.; Campos, D. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry* 127: 1576–1583. (2011)
- [2]. Esparza, Eliana; Hadzich, Antonella; Kofer, Waltraud; Mithöfer, Axel; Cosio, Eric G. Bioactive maca (*Lepidium meyenii*) alkaloids are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry*, 116, 138-148. (2015)
- [3]. Gonzales, G. F. "Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 193496, 10 pages, (2012)
- [4]. Manuel Sandoval, Nataly N. Okuhama, Fausto M. Angeles, Vanessa V. Melchora, Luis A. Condezob, Juan Laob, Mark J.S. Miller. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 79 207–213 (2002)
- [5]. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Córdava, A.; Chung, A.; Rubio, J.L. "Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m)", *Journal of Endocrinology*. 2004, v. 180, n. 1, p.87–95
- [6]. Zenico, T.; Cicero, A.F.; Valmorri, L.; Mercuriali, M.; Bercovich, E. "Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial." *Andrologia*. 41, 2, 95-9, (2009)
- [7]. Libertad Alzamora, Evelyn Alvarez, Dina Torres, Hilda Solís, Erasmo Colona, Jenny Quispe y Magda Chanco. "Effect of four ecotypes of *Lepidium peruvianum* Chacón on the production of nitric oxide in vitro" *Rev. Per. Biol.* 13.3. (2007)
- [8]. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. "Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition." *Bioorg Med Chem*. Sep 1; 21(17):5188-97. (2013)
- [9]. McCollom, M.M.; Villinski, J. R.; McPhail, K.L.; Craker, L.E.; Gafner, S. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochemical Analysis* 16: 463–469. (2005)
- [10]. Shu-Xiao Chen, Ke-Ke Li, Duoqi Pubu, Si-Ping Jiang, Bin Chen, Li-Rong Chen, Zhen Yang, Chao Ma, Xiao-Jie Gong. "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction, HPLC and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Analysis of, Main Macamides and Macaenes from Maca (Cultivars of *Lepidium meyenii* Walp)", *Journal Molecules*, 2017
- [11]. Ganzera, M.; Zhao, J.; Muhammad I.; Khan, I.A. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 988–991. (2002)

Recibido el 11 de mayo del 2018 y aceptado para su publicación el 23 de junio del 2018