

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE MUESTRAS DE MACA DE LA EMPRESA
NATURALCOS PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE
EXTRACCIÓN**

SERGIO DANIEL TORREZ ALVAREZ

LA PAZ – BOLIVIA

2018

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE MUESTRAS DE MACA DE LA EMPRESA
NATURALCOS PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE
EXTRACCIÓN**

UNIVERSITARIO: SERGIO DANIEL TORREZ ALVAREZ

TUTORA: PhD. GIOVANNA R. ALMANZA VEGA

LA PAZ – BOLIVIA

2018

Dedicatoria.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a la empresa NATURALCOS S.A., por haberme dado la oportunidad de realizar las prácticas profesionales para su empresa, las que ayudaron desarrollarme como profesional.

También agradecer a todos aquellos que me inspiraron.

De igual forma, agradecer a mi familia, especialmente a mi madre, Segura, por apoyarme siempre y sobre todo por brindarme la oportunidad de trabajar.

A mis amigos Jenry, Fernando, Oscar y Macguiver, que me apoyaron en todo momento.

Y como olvidar a mis profesores, especialmente al Lic. Santiago Tarqui, por sus enseñanzas e inicios, y en el transcurso de mi vida.

Así mismo, al Instituto de Investigaciones, por las instalaciones del Laboratorio y los equipos necesarios para poder realizar mi trabajo.



En especial, agradecer a mi familia, especialmente a mi madre, Segura, por apoyarme siempre y sobre todo por brindarme la oportunidad de trabajar.

De igual forma, agradecer a mi familia, especialmente a mi madre, Segura, por apoyarme siempre y sobre todo por brindarme la oportunidad de trabajar.

A mis amigos Jenry, Fernando, Oscar y Macguiver, que me apoyaron en todo momento.

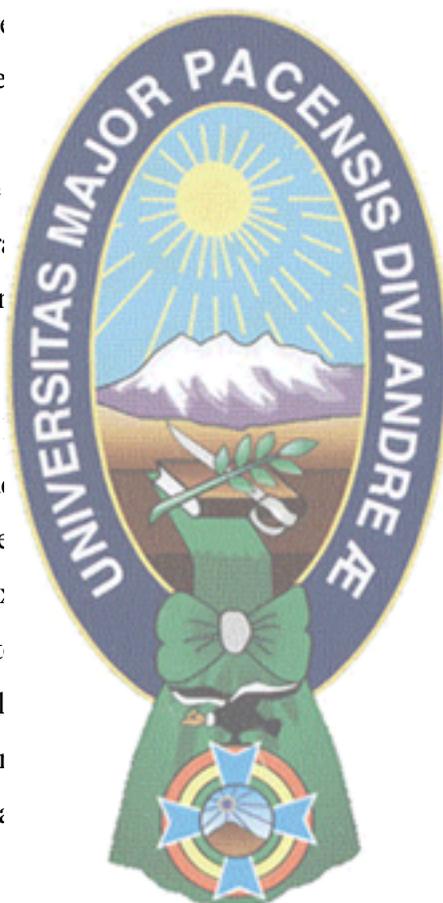
Y como olvidar a mis profesores, especialmente al Lic. Santiago Tarqui, por sus enseñanzas e inicios, y en el transcurso de mi vida.

Así mismo, al Instituto de Investigaciones, por las instalaciones del Laboratorio y los equipos necesarios para poder realizar mi trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo, se analizó los metabolitos presentes en muestras de extracto hidroalcohólico y harina de maca (*Lepidium meyenii* Walp) utilizados comercialmente en la empresa NATURALCOS. Para esto, primeramente, se empleó un punto de vista cualitativo, enfocándose en la identificación de grupos de metabolitos, mediante un estudio fitoquímico por Wagner para alcaloides, Lieberman-Burchard para reductores, prueba de ensayo de gelatina para Bortrager para quinonas y prueba de Antocianidinas.

Una vez identificados a buscar el solvente adecuado para con dicho solvente metabolitos de este extracto empezando con acetato (90:10), acetato de etil las 30 fracciones obteniendo un compuesto mayoritario LH – 20, empleado mayoritario buscado. Por análisis de resonancia magnética nuclear se determinó que el metabolito aislado un derivado de la fructosa.



se empleó el método de Dragendorff, Mayer y Fehling para azúcares, prueba de Fehling para azúcares, prueba de cloruro férrico para fenoles, prueba de aminoácidos libres, ensayo de Lieberman-Burchard y prueba de antocianidinas.

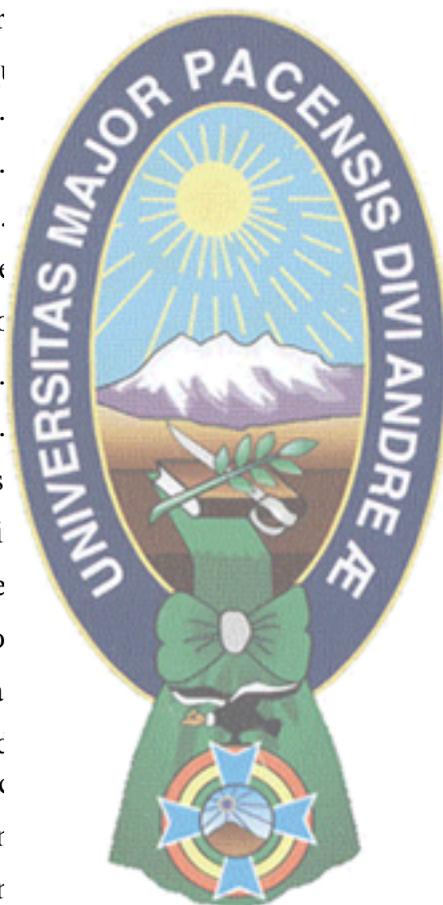
Una vez identificados los metabolitos del extracto de la empresa, se procedió a la separación de fracciones de mediana polaridad, comenzando en una escala mayor. Se separaron las fracciones usando 200 mL de solvente (95:5), acetato de etilo/acetona (70:25:5). De las fracciones 9 hasta la 16 para separar el compuesto mayoritario se realizó una columna sephadex LH-20. En la fracción 9 se logró separar el metabolito mayoritario.

INDICE.

CAPÍTULO 1	1
1.1. INTRODUCCIÓN.	1
1.2. MARCO TEÓRICO.....	2
1.2.1. Antecedentes.	2
1.2.2. Clasificación tax	3
1.2.3. Descripción bot.....	4
1.2.3.1. Distribución y Walpers.	5
1.2.3.2. Caracterizació iii Walpers.	6
1.2.4. Usos de la <i>Lepic</i>	8
1.2.5. Constituyentes c.....	9
1.2.5.1. Glucosinolatos.....	9
1.2.5.2. Ácidos grasos.....	11
1.2.5.3. Esteroles.	13
1.2.5.4. Carbolinas.	14
1.2.5.5. Flavonoides. ...	15
1.2.5.6. Alcaloides.....	16
1.2.6. Análisis fitoquí.....	17
1.2.6.1. Tamiz fitoquí.....	17
1.2.7. Cromatografía li.....	18
1.2.8. Cromatografía p.....	19
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	19
CAPÍTULO 2	21
2. OBJETIVOS.	21
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO 3.....	22
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
3.1. MATERIAL VEGETAL EN ESTUDIO.	22



3.2. EQUIPOS Y REACTIVOS.....	23
3.2.1. Equipos, Materiales y reactivos.	23
3.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS.....	24
3.3.1. Estudio fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de maca de NATURALCOS.....	24
3.3.1.1. Secado del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS para la determinación de rendimiento de extr	24
3.3.1.2. Análisis Fitoquímico del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS.....	24
a) Alcaloides.....	25
b) Test para Quinonas.....	26
c) Test de Azúcares Reducidos.....	26
d) Test de Aminoácidos.....	27
e) Test de Taninos.....	27
f) Test de Saponinas.....	27
g) Test de compuestos fenólicos.....	27
h) Test de Antocianidinas.....	28
i) Test para flavonoides.....	28
j) Test para Triterpenos.....	28
k) Prueba para lactonas.....	28
3.3.2. Determinación de condiciones para la obtención de un extracto hidroalcohólico.....	29
3.3.2.1. Determinación de la concentración de maca.....	29
3.3.2.2. Determinación de la temperatura de extracción.....	30
3.3.3. Estudio fitoquímico dirigido a la obtención de compuesto de interés farmacológico.....	30
3.3.3.1. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC).	30
3.3.3.2. Extracción de metabolitos del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS. ...	31
3.3.3.3. Separación por columna VLC.....	32
3.3.3.4. Separación por columna Sephadex LH-20.....	32
CAPÍTULO 4.....	33
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES.....	33



ESTUDIO FITOQUÍMICO DE MUESTRAS DE MACA DE LA EMPRESA NATURALCOS PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

Cuando aún el hombre
aliviar diversos dolores
raíces de las plantas
indicadas que pudieran

En cada región del mundo
que le permitieron la selección
las plantas desarrollarse
aún desconocemos las especies
adaptarse al ecosistema

En nuestra región, por
que llegan a crecer por
la fuerte radiación UV,
es la maca (*Lepidium*
distintos trastornos de
de los andes, tanto en la



cia, ante la necesidad de tratar y
só usar frutos, hojas, tallos y
erando encontrar las especies

tes cualidades y características,
que habitaban. En este sentido,
undarios, de los que gran parte
añan, que a su vez le permiten

del mar, pocas son las plantas
a las que son sometidas, como
ntre otros. Una de estas plantas,
rsas raíces que se utilizan para
da y se puede hallar en la región

Esta planta es usada comúnmente en la medicina tradicional e incluso ya es implementada a nivel industrial. En Bolivia, normalmente las empresas encargadas de la distribución de productos de maca, no tienen un estricto control químico que permita hacer el seguimiento de la composición de extractos y productos derivados de las plantas que se comercializan. Por lo que es de suma importancia realizar un seguimiento químico de los procesos, y más

aún, una metodología más eficiente para la extracción de compuestos bioactivos, que puedan aumentar los beneficios en los productos comerciales.

La empresa de NATURALCOS se encarga de la comercialización de la harina de maca, tanto como harina tratada (MACA SPIRIT) o como harina concentrada (MACA FORTE). La última se caracteriza por poseer una mayor concentración de metabolitos, debido a la adición de un extracto

Por lo anteriormente e fitoquímicos, de la har así como del extracto permitan contribuir al proceso de extracción.

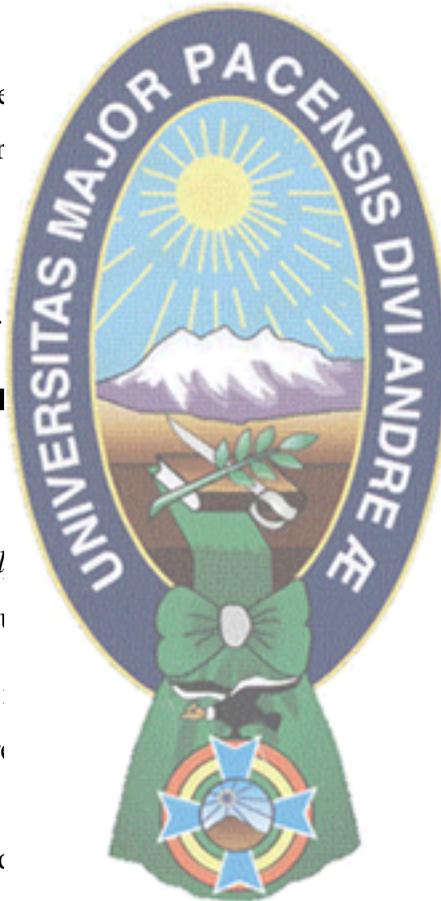
1.2. MARCO TEÓRI

1.2.1. Antecedentes.

Lepidium meyenii Wal andes centrales de Per

Fue domesticada hace la actualidad con la cr sexual de humanos y andes. Se ha encontra lo tanto, que fue parte de la dieta cotidiana del antiguo poblador de los Andes.

Según los cronistas de los siglos XVI y XVII, las tropas incaicas fueron alimentadas con maca por las atribuciones de vitalidad, fortaleza física que tenían eran muy buenas para los combatientes.



extraídos de la harina de maca.

o en la realización de estudios otos (Maca Forte y Maca Spirit) ducto tratado Maca Forte, que química, así como a mejorar el

ia *Brassicaceae*, oriunda de los n sobre el nivel del mar¹.

ó durante la época colonial hasta jorar la fertilidad y la actividad rasicaceas domesticada en los preincaicos, entendiéndose, por

¹ Balick MJ, Lee R. Maca: from traditional food crop to energy and libido stimulant. *Altern Ther Health Med.* 2002; 8:96-8.

Con la llegada de los españoles, se han encontrado algunos registros de cronistas que relataban lo agreste del campo donde crecía la Maca. También hacen una analogía entre la Maca y el pan español, como comida diaria de los indígenas. Luego que los conquistadores conocieron las bondades de la Maca, fue utilizada e incluida entre los productos con los que se podían pagar tributo los pobladores andinos. Uno de los usos que se le dio fue como alimento de los animales traídos como las yeguas, cerdos, potros, burros y gallinas.

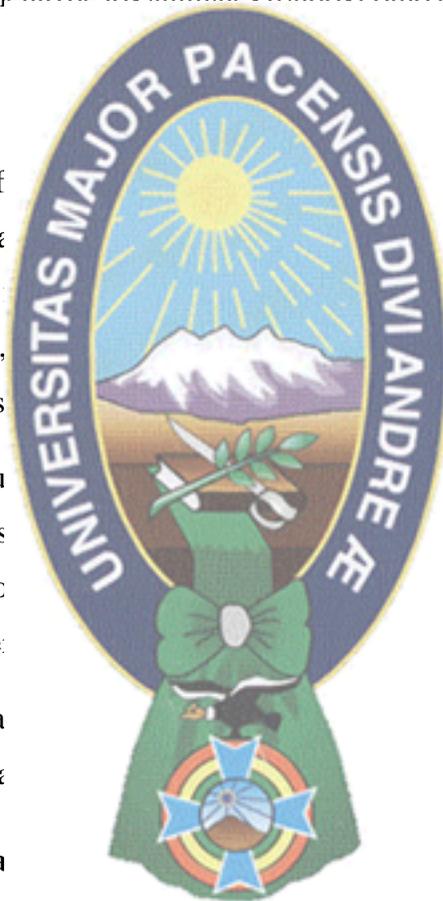
El termino *Lepidium* alusión a su fruto de f chibcha, en la que “ma de comida buena que maino, ayok, chichira, propiedades atribuidas

A pesar del amplio u marginada por muchos uso, a realizarse mayc que traspasa las fronte

Hoy su cultivo es ma encontrado evidencia z

1.2.2. Clasificación ta

En 1990 la botánica Gloria Chacón de Popovici describió la maca domesticada y ampliamente cultivada como *Lepidium peruvianum* (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su hábitat. Otros botánicos dudan hoy de la distinción entre *Lepidium peruvianum* y *Lepidium meyenii*. El nombre latino reconocido actualmente por el USDA sigue siendo únicamente *Lepidium meyenii*. Hay un debate aún en curso acerca de la nomenclatura



significa pequeña escama, en tiene de dos voces de la lengua (altura) y “ca” de excelso, alto, s para la maca son maca-maca, como ginseng peruano por las

) y la colonia, esta planta fue la que se empieza a revalorar su lograrse una comercialización

Peruanos y Bolivianos, se ha a desde el año de 1600 A.C.

² Lock Oiga, Rojas Rosario. “Química y Farmacología de *Lepidium meyenii* Walp ("Maca")”

correcta, y sobre si la distinción entre *L. meyenii* y *L. peruvianum* botánicamente es correcta o si son la misma especie.³

Considerando todas las categorías taxonómicas, la clasificación de la *Lepidium meyenii* Walpers es la siguiente:

Tabla 1. Taxonomía de la *Lepidium meyenii* Walpers en Reino, División, Clase, Orden,

Familia, Género

ción gráfica de la misma.

Reino
División
Clase
Orden
Familia
Género
Especie



Fuente de la imagen: vector-de-la

5772_ilustraci%C3%B3n-del-lepidium-meyenii-.html

1.2.3. Descripción botánica

Es pequeña y achatada. Hojas pinnadas y dentadas que descansan cerca del suelo. Esta roseta es ligeramente circular, y se forma desde el tallo y del eje central del fruto. Cuando sus hojas exteriores mueren, hay una constante formación de nuevas hojas desde el centro de la roseta. El blanco-gris de sus flores autofecundas se eleva de un tallo central. Son típicamente parte de la familia de la mostaza. Sus semillas ovoides tienen aproximadamente 2 mm de longitud. La parte comestible de la planta es el tubérculo, porción de la planta en la que la raíz se une al tallo. Estas “raíces” abultadas

³ https://es.wikipedia.org/wiki/Lepidium_meyenii

semejante a peras invertidas tanto en tamaño (arriba de los 8 cm. de diámetro), como en forma. Su raíz tuberosa se parece al rábano y su color puede variar de amarillo a rojo o incluso hasta un morado muy oscuro (ecotipo negro).

Se cultivan más de ocho ecotipos diferentes de maca, los que se distinguen de acuerdo con el color de sus raíces, siendo, como ya se mencionó, el amarillo, rojo y negro los principales, de los que la maca es comestible. Los hipocótilos de la maca son utilizados por muchos pueblos indígenas de los Andes. Los hipocótilos se pueden secar y almacenarse para su posterior consumo⁴.



Figura 1. Hipocótilo de maca.

Fuente: <http://www.umsa.edu.bo>

1.2.3.1. Distribución de *Lepidium meyenii* Walpers.

La *Lepidium meyenii* Walpers se distribuye en los Andes centrales de Perú, Bolivia y noroeste de Argentina. En Perú esta especie tiene hoy en día un área limitada de distribución y cultivo. Está casi restringida a los departamentos de Junín y Pasco. Las áreas de cultivo de mayor extensión se encuentran en los alrededores del lago Junín, cerca de Huayre, Carhuamayo, Uco, Ondores, Junín, Ninacaca y Vicco. Posibles ocurrencias de

⁴ Romero Violeta, Tirado Arminda, Durán Mónica, Dávalos Juan Z., “Propiedades energéticas de la harina de maca (*Lepidium peruvianum* Chacón o *Lepidium meyenii* Walpers)”

poblaciones silvestres (o de poblaciones asilvestradas) se han señalado para las montañas de Ichuasi en Puno y para los sectores de Torata y Carumas en Moquegua. Se asume que el cultivo de la maca ya estaba ampliamente repartido en Perú en los siglos XVI y XVII. Probablemente la maca fue cultivada más tempranamente, al menos en Cusco y en la cuenca del lago Titicaca. Está adaptada a condiciones ecológicas muy frías donde otro cultivo no podría prosperar. Estas zonas se caracterizan por tener temperaturas promedio entre 4°C - 7°C, alta irradiancia solar, vientos fuertes con suelos ácidos (PH<5).⁵

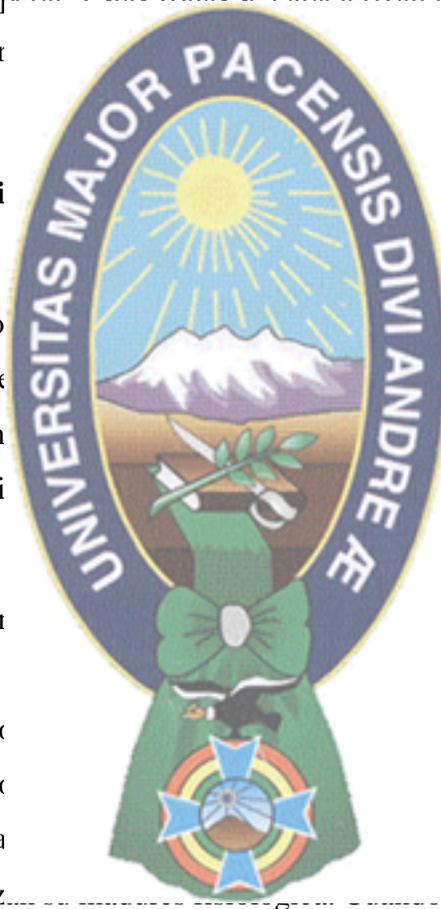
1.2.3.2. Caracterización

El tallo de la maca es grueso y corto, aproximadamente uno a dos centímetros de diámetro, cónico, acaulescente, es decir, sin tallo longitudinalmente, a nivel del suelo un cono invertido similar a un cono.

Las hojas de la Maca son alternas, esparcidas. En la base del tallo las hojas se presentan arrolladas, como si fueran los duros golpes ocasionados por las heladas nocturnas, a la altura de 9 cm. Cuando alcanzan los 15 cm de altura,

las hojas que se encuentran en la parte extrema del follaje arrocetado, se enrollan, secan y caen; Mientras que las hojas interiores están verdes y erguidas. Del centro de este follaje arrocetado salen varios péndulos que más tarde van a sostener las flores.

Las flores de la maca son axilares, hermafroditas, actinomorfas, de color verde no vistosas, aproximadamente miden 3 mm de largo por 2 mm de diámetro. El cáliz es imbricado con



yenii Walpers.

El tallo es grueso y corto, reducido, pudiendo alcanzar una forma de un disco más o menos plano, siendo notorio cuando es cortado longitudinalmente, se distingue el tallo en forma de un cono invertido.

Las hojas de la Maca son alternas, esparcidas. En la base del tallo las hojas se presentan arrolladas, como si fueran los duros golpes ocasionados por las heladas nocturnas, a la altura de 9 cm. Cuando alcanzan los 15 cm de altura, las caulinares algo reducidas, con el limbo doblemente partido. Las hojas interiores están verdes y erguidas. Del centro de este follaje arrocetado salen varios péndulos que más tarde van a sostener las flores. Las hojas llegan a medir de 6 a 9 cm. Cuando alcanza la planta llega a cierta madurez,

⁵ <https://www.monografias.com/trabajos39/la-maca/la-maca.shtml>

4 sépalos libres de color verde claro, con márgenes blanquecinos. La corola presenta 4 pétalos libres ligeramente encorvados hacia el ápice. El androceo tiene seis estambres tetradínamos, siendo dos de ellos fértiles, con granos de polen más o menos aovados de color amarillo, los cuatro estambres restantes son estériles y pequeños dispuestos a los lados de los fértiles. El gineceo es sincarpico, con ovario súpero, bicarpelar y bilocular.

La planta presenta un tallo erecto de 15 cm. de longitud, nace y se ramifican. La inflorescencia es terminal de longitud; siendo la inflorescencia también tienen de 5 a 8 cm.

La semilla botánica de la Maca es similar a la de algunas hortalizas tales como la zanahoria, por lo que al determinar el momento de distribuir la semilla se debe utilizar un material inerte para que no se desmenuce en ausencia de viento; la semilla es más o menos ovoide o elíptica, con un hilo presente en uno de los extremos. Para que se germinen eficientemente se requiere que la semilla esté bien conformada.

La raíz de la Maca, que es la parte que se introduce en el suelo, presenta en su extremo superior una parte carnosa que se ramifica en

introduce rectamente en el suelo, presentando a todo su largo ramificaciones secundarias delgadas. El color de la parte tuberosa es amarillento claro, en algunos ecotipos es de color morado o casi negro o rosado pardusco, estos tres tipos son diferenciados por los campesinos, quienes prefieren el primero. El tamaño de esta parte carnosa es variado pudiendo alcanzar de 5 a 6 cm, de diámetro transversal y de diámetro longitudinal de 4 a 7 cm. De longitud. La parte superior termina en una superficie plana, de donde brotan las hojas; la inferior que se halla a continuación de la parte que se acaba de indicar, es cónica



superior de la raíz, siendo de 14 a 16 cm. de longitud. El tallo florífero unos péndulos que son raramente simple de 16 cm de longitud. Las hojas son pinnatipartidas, cuyos ejes

son similares a la de algunas hortalizas. El momento de determinar el momento de distribuir la semilla se debe utilizar un material inerte para que no se desmenuce en ausencia de viento; la semilla es más o menos ovoide o elíptica, con un hilo presente en uno de los extremos. Para que se germinen eficientemente se requiere que la semilla esté bien conformada.

La raíz de la Maca, que es la parte que se introduce en el suelo, presenta en su extremo superior una parte carnosa que se ramifica en

y se alarga alcanzando hasta 30 cm aproximadamente, adelgazándose paulatinamente hacia el ápice terminal⁶.



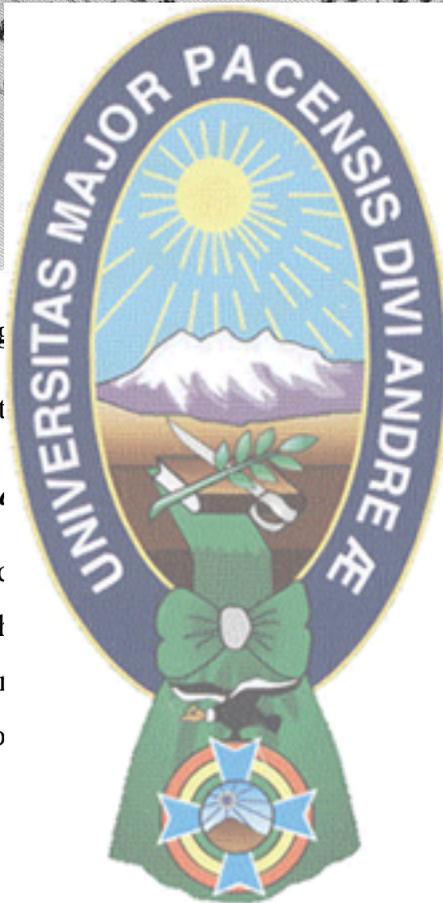
Fig. 1. Inflorescencia de *Lepidium meyenii* Walpers.

Fuente: <http://www.quieroapuntos.com/cultivo-de-maca.html>

1.2.4. Usos de la *Lepidium meyenii*

Se le atribuye propiedades afrodisíacas y se le atribuye propiedades que prestan fecundidad a los machos. Diversas investigaciones farmacológicas experimentales han demostrado tener propiedades afrodisíacas.

por los que muchos creen que mejora la fertilidad en los hombres. Años, diversas investigaciones han demostrado que la maca puede tener propiedades afrodisíacas.



⁶ <http://www.quieroapuntos.com/cultivo-de-maca.html>

⁷ Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, et al. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 2000; 55:598-602.

⁸ Cicero AFG, Bandieri E, Arletti R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J Ethnopharmacol.* 2001; 75:225-9.

⁹ Cicero AFG, Piacente S, Plaza A, Sala E, Arletti R, Pizza C. Hexanic Maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic Maca extracts. *Andrologia* 2002; 34:177-9.

¹⁰ Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Góñez C, Castillo S. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrologia* 2002; 34:367-72.

(Proceso de formación de las células sexuales masculinas, desde la espermatogonia hasta los espermatozoides.)^{11, 12, 13, 14, 15.}

Los usos de la maca como Medicina natural, se sustentan en investigaciones preclínicas en las que se le han demostrado efectos farmacológicos tales como inmunomodulación, antioxidante, antimutagenica, estrogenica y progestagena. A su vez, estos efectos se deben a la presencia de compuestos (metabolitos secundarios), tales como alcaloides, flavonoides, glicosidos, saponinas, taninos, etc.

1.2.5. Constituyentes

Con respecto al valor nutritivo de maca contienen aproximadamente 15% de proteínas esenciales. Por otra parte, contiene cantidades de hierro y calcio.

1.2.5.1. Glucosinolatos

También llamados "glucosinolatos secundarios de las plantas crucíferas", son metabolitos secundarios de las plantas crucíferas por las enzimas mirosinasa.



Se ha determinado que los hipocótilos secos de maca contienen aproximadamente 15% de proteínas y son ricos en aminoácidos esenciales. Contienen un 80% de agua así como altas cantidades de calcio.

Los glucosinolatos, llamados "glucosídeos", son metabolitos secundarios de las plantas crucíferas, que se hidrolizan por las enzimas mirosinasa.

¹¹ Gonzales GF, Cordova A. Effect of maca on semen parameters in adult male rats. J Ethnopharmacol. 2003; 98:143-7.

¹² Gonzales GF, Ruiz A, Gonzalez C, Gasco M, Villegas L. Effect of maca on spermatogenesis of male rats. J Ethnopharmacol. 2003; 98:143-7.

¹³ Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. Asian J Androl. 2003; 5:349-52.

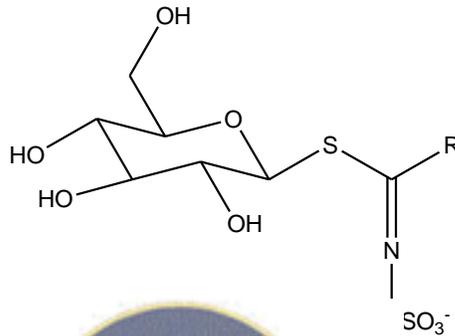
¹⁴ Gonzales GF, Gasco M, Córdova A, Chung A, Rubio J, Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). J Endocrinol. 2004; 180:87-95.

¹⁵ Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M, Gonzales GF. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. J Ethnopharmacol. 2005; 98:143-7.

¹⁶ Palma Gutiérrez Edgardo, Prado Bravo Christian, Loja Herrera Berta, Salazar Granara Alberto, "CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE MUESTRAS COMERCIALES DE MACA EN TRES REGIONES DE PERÚ", Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología. Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP), Lima, Peru.

¹⁷ Valdivia Zambrana1Hernán Boris, Almanza Giovanna, "Evaluación del contenido de minerales de *lepidium meyenii*, maca natural boliviana".

¹⁸ <https://es.wikipedia.org/wiki/Glucosinolatos>



F

Químicamente son glucosinolatos, una clase de tioglucosidos que se encuentran en algunos casos a ciertos tejidos de la planta, constituyendo un tipo de metabolito secundario.

La maca contiene glucosinolatos, los cuales son hidrolizados por la enzima mirosinasa, presente naturalmente en el tracto digestivo en el humano. Los glucosinolatos son una clase de tioglucosidos que se encuentran en algunos casos a ciertos tejidos de la planta, constituyendo un tipo de metabolito secundario. La enzima mirosinasa, presente naturalmente en el tracto digestivo en el humano, hidroliza a los glucosinolatos en un número importante de compuestos químicos, los cuales pueden estar presentes en los extractos de maca.

osinolatos.

osa. Los glucosinolatos son una clase de tioglucosidos que se encuentran en algunos casos a ciertos tejidos de la planta, constituyendo un tipo de metabolito secundario. Los glucosinolatos son una clase de tioglucosidos que se encuentran en algunos casos a ciertos tejidos de la planta, constituyendo un tipo de metabolito secundario. La enzima mirosinasa, presente naturalmente en el tracto digestivo en el humano, hidroliza a los glucosinolatos en un número importante de compuestos químicos, los cuales pueden estar presentes en los extractos de maca.

abolito secundario. La enzima mirosinasa, presente naturalmente en el tracto digestivo en el humano, hidroliza a los glucosinolatos en un número importante de compuestos químicos, los cuales pueden estar presentes en los extractos de maca.

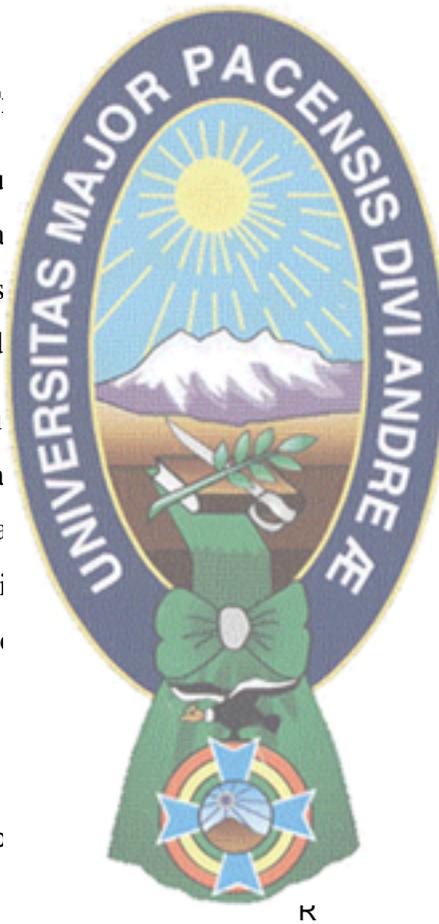
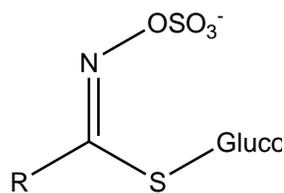


Figura 4. Hidrólisis de glucosinolatos por acción de mirosinasas.

Los glucosinolatos más abundantes detectados tanto en el hipocótilo fresco como seco y en las hojas de maca fueron el glucosinolato aromático, bencilglucosinolato (a). Li y Johns han reportado la presencia de m-metoxibencilglucosinolato (b) y p-metoxibencilglucosinolato (c), sin embargo, estudios realizados por Dini y Piacente no muestran la presencia de p-metoxibencilglucosinolatos (Fig. 5).

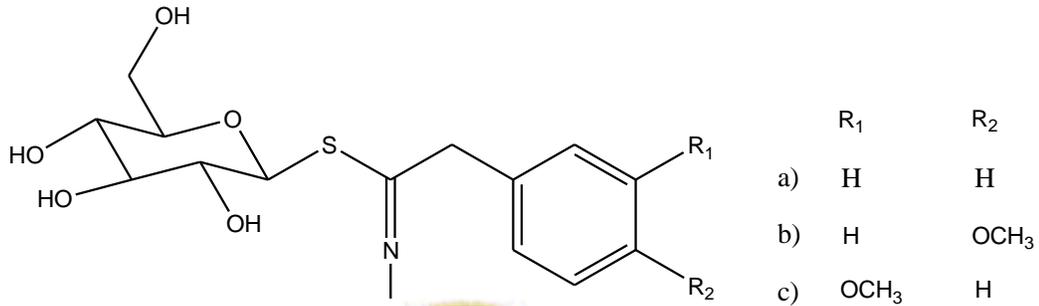


Figura 5. Estructura c

El principal compor glucosinolatos pueden su hidrólisis a bencil- contenido absoluto de mayor a los reportados

, m-metoxibencilglucosinato to (c).

el bencilglucosinato. Estos gicamente activos por acción de cil isotiocianato (e), siendo el frescos de maca relativamente|

- d) H
- e) OCH₃

R

Figura 6. Estruct

to (d) y el p-metoxibencil

1.2.5.2. Ácidos grasos

De la fracción lipídica de la maca se han determinado, por HPLC, las alcanmidas benciladas (macamidias), entre ellos la N-bencil-octadecanamida, N-bencil-16-hidroxi-9 oxo-1 OE, 12 E, 14 E-octadecatrienamida, N-benci 1-9,1 6-d ioxo-1 OE, 12E, 14E octadecatrienamida (f), así como N-bencilhexadecanamida (g), N-bencil-5-oxo-6E,8Eoctadecadienamida (h), el cetoacido aciclico, acido 5-oxo-6E,8E octadecadienoico (i) (Fig. 7) y la 1,2-dehidro-N-hidroxipiridina (j), esta última conocida como macaridina. Se han realizado análisis cuantitativos por HPLC de macaenos y macamidias en productos

comerciales de maca, observándose que el contenido de estos compuestos es muy variable (0,15 a 0,84%)

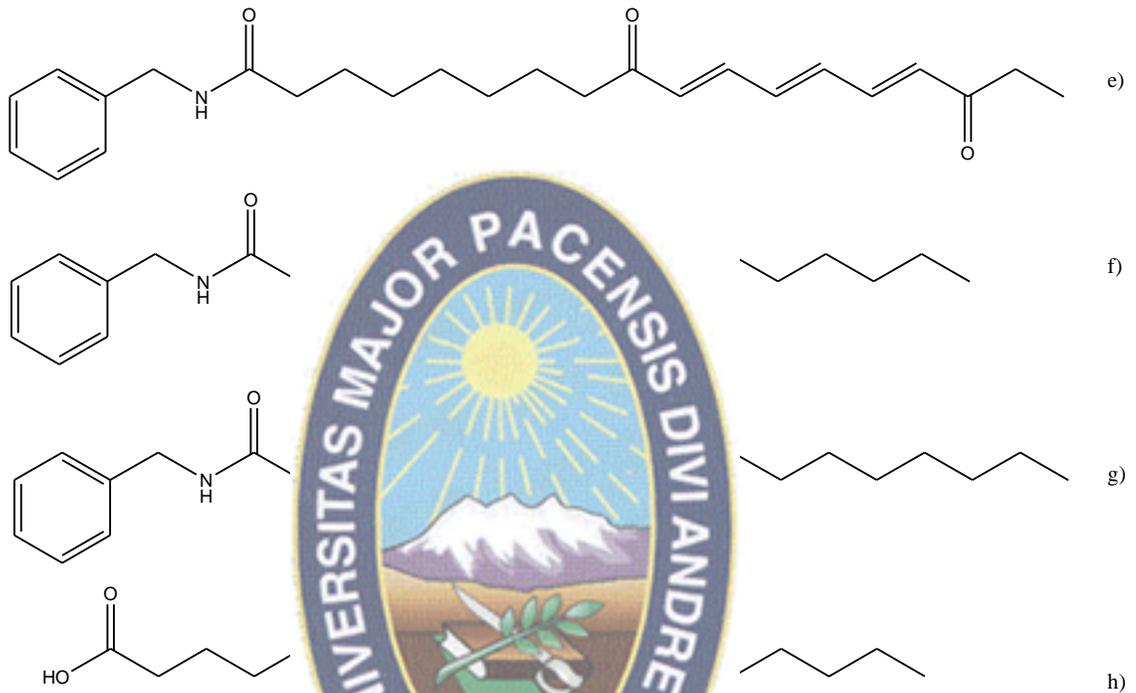


Figura 7. Estructura química de N-bencil-16-hidroxi-9-oxo-1,6-dioxo-1,12E,14E-octadecatrienamida (g), N-bencil-5-oxo-5-oxo-6E,8E-octadecadienoico

a, N-bencil-16-hidroxi-9-oxo-1,6-dioxo-1,12E,14E-octadecatrienamida (g), N-bencil-5-oxo-5-oxo-6E,8E-octadecadienoico

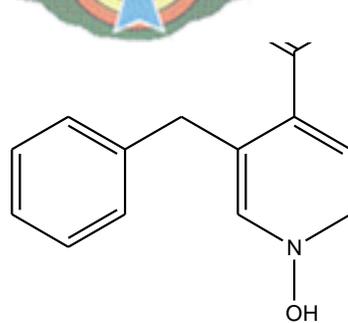


Figura 8. Estructura química del Macaridina (j).

1.2.5.3. Esteroles.

Los esteroides presentes en la maca son: β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Fig. 9, 10 y 11, respectivamente).

El β -Sitosterol es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitoesteroides, que son los esteroides que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol, que cumple la función de las membranas celulares. Campesterol y campestano son similares al colesterol. La investigación de ciertos cánceres, incluidos los cánceres de mama y colon. Los estudios también han indicado que el β -sitosterol puede ser útil en la prevención de ciertos tipos de cáncer. Los estudios también han indicado que el β -sitosterol puede inhibir la absorción de colesterol y los niveles de colesterol en la sangre. Los estudios también han encontrado que tanto el β -sitosterol como el campesterol poseen propiedades antioxidantes, h

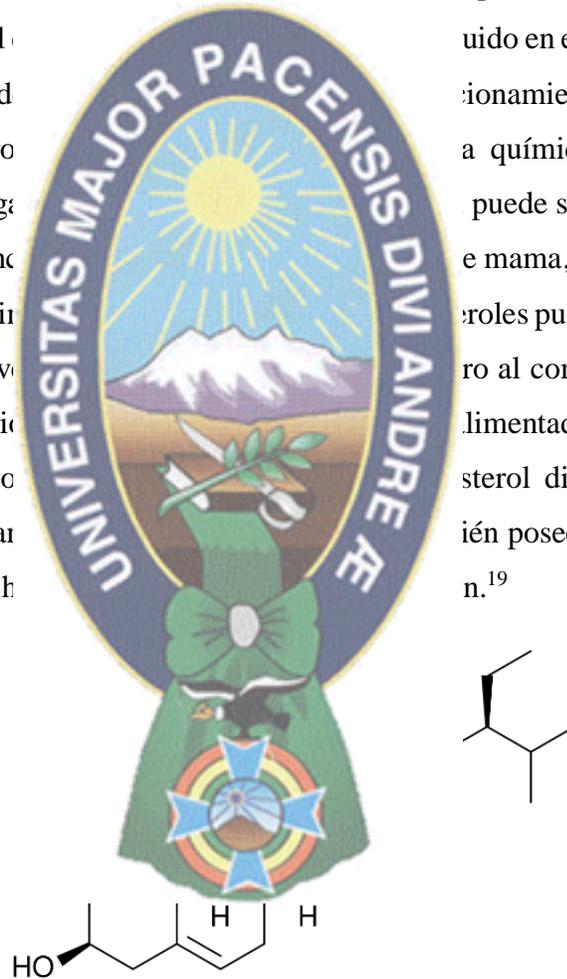
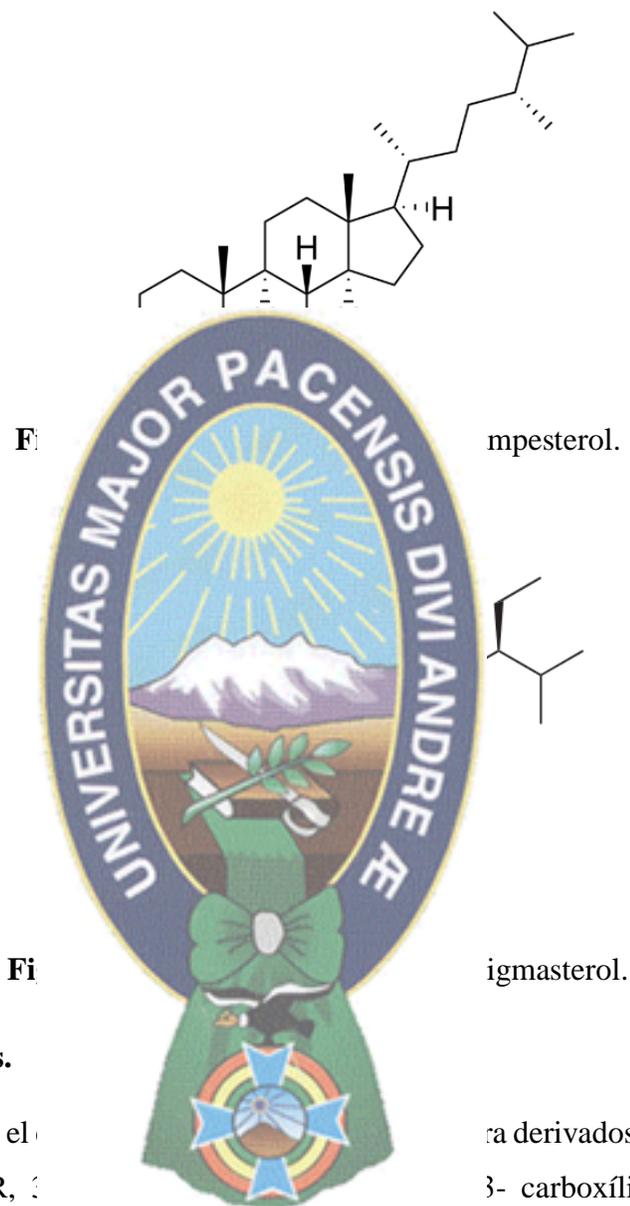


Figura 9. Estructura química del β -sitosterol.

¹⁹ Panda S, Jafri M, Kar A, Meheta BK. (2009). "Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*". *Fitoterapia* 80.



1.2.5.4. Carbolinas.

Se ha reportado que el ácido maleico (1R, 2S) y el ácido fumarico (1R, 2R) se generan por reacciones que se dan generalmente en alimentos que son dependientes del pH y la temperatura.

Para derivados benzoilos del ácido 3- carboxílico (Fig. 12), estos

En las últimas dos décadas se ha prestado mayor atención a las tetrahidrocarbolinas por sus efectos biológicos.

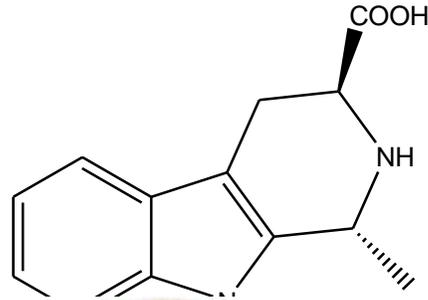


Figura 12. Estructu

etil-tetrahydro-β-carbolina-3-

1.2.5.5. Flavonoides.

Los flavonoides son r
cetona y normalmente
latín flavus, "amarillo"

os comúnmente con un grupo
de donde viene su nombre (del

Entre los flavonoides p
(Fig. 14).

vonol (Fig. 13) y la quercetina

Flavonoles son una c
hidroxiflavona. Su divi
-OH. Son distintos
flavonoides.²¹

mo columna vertebral a la 3-
posiciones de los grupos fenólico
no catequina), otra clase de

La quercetina es un fla

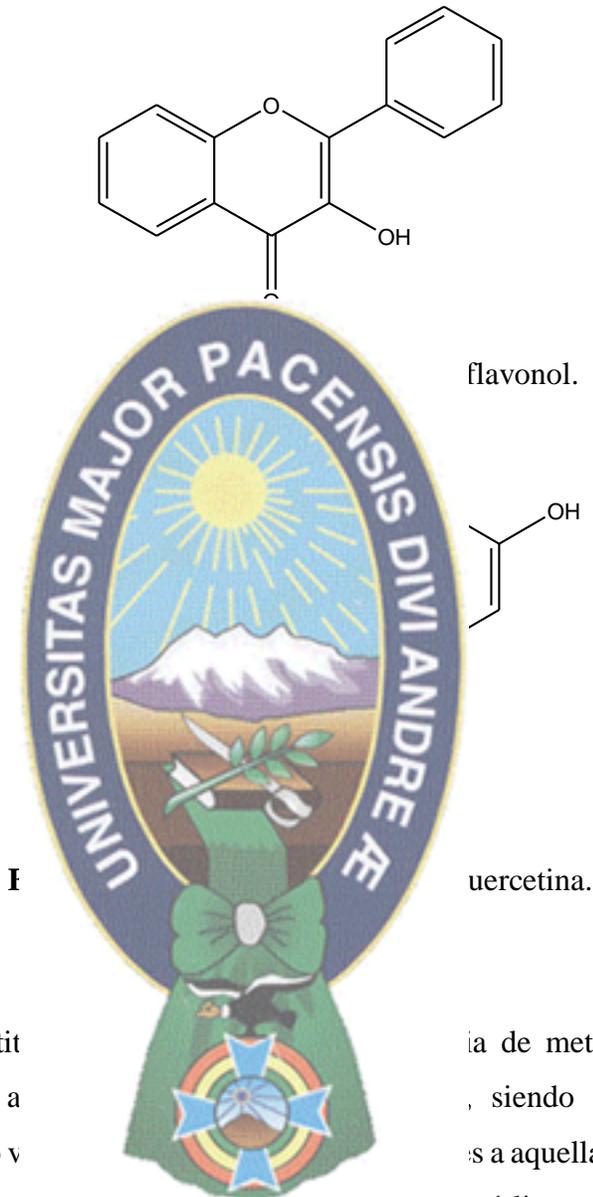
teralmente como O - glicósidos

en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras en especial en la cebolla. Es el flavonoide más abundante y el más habitual en la dieta humana. Forma parte de otros flavonoides, como la naringenina o la rutina, que tienen grupos de azúcar unidos a ella. ²²

²⁰ <https://www.fundacion-canna.es/flavonoides>

²¹ <https://es.wikipedia.org/wiki/Flavonol>

²² <https://es.wikipedia.org/wiki/Quercetina>



1.2.5.6. Alcaloides.

Los alcaloides constituyen una clase de compuestos orgánicos importantes debido a su amplia distribución y a su frecuencia en el reino vegetal. Se caracterizan por poseer uno o más átomos de nitrógeno en su sistema cíclico que poseen actividad farmacológica.

En la maca se han encontrado dos compuestos nuevos, dos alcaloides imidazólicos (Lepidilina A y Lepidilina B) aislados a partir de los extractos de los hipocótilos de la planta, estos han sido químicamente identificados como 1) Clorhidrato de 1,3-dibencil-4,5-dimetilimidazol y 2) Clorhidrato de 1,3-dibencil-2,4,5-trimetilimidazol (Fig. 13).

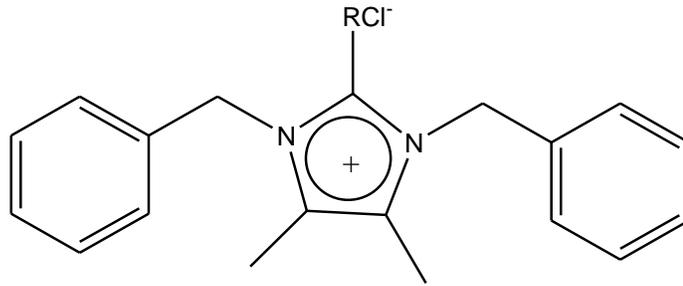


Figura 15. Estructura del cloruro de 1,2-bis(bencil-4,5-dimetilimidazol y etilimidazol

ibencil-4,5-dimetilimidazol y etilimidazol

Otros compuestos presentes en los extractos de prostaglandinas y las enzimas de los hipocótilos de maca.

ácido málico, así como las enzimas responsables del color externo de los

1.2.6. Análisis fitoquímico

La fitoquímica comprende el estudio de los compuestos vegetales, los cuales pueden ser taninos, cumarinas, terpenos, glucósidos y saponinas. Para conocer el tipo de compuestos presentes se utilizan técnicas como el análisis cromatográfico de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectroscopía (Locket, 1988).



secundarios presentes en especies vegetales como las isoflavonas, flavonas y flavonoides, terpenos, lectinas y polipéptidos, además de esteroides y xantonas. Para el análisis se pueden usar diferentes técnicas, como el análisis Fitoquímico Preliminar), cromatografía de líquidos de alta resolución, espectroscopía infrarroja, entre otras

1.2.6.1. Tamiz fitoquímico.

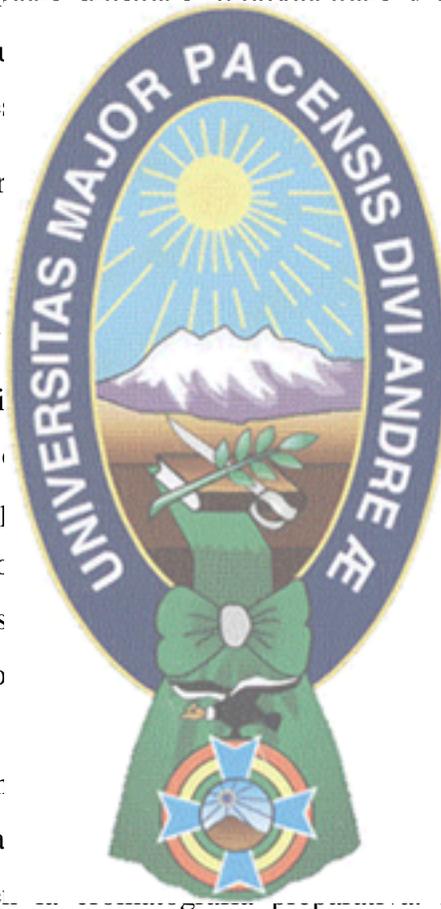
Aunque en la actualidad existen técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos tradicionales aún constituyen una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición. Cuando se investigan muchos extractos de plantas, esto constituye una ventaja ya que permite descartar todas aquellas especies

que no tienen potencial para ser utilizadas para algún beneficio farmacológico, quedando solamente las que sí lo tienen. El tamiz fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides (Prashant *et al.*, 2011). Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de las reacciones evalúan grupos funcionales como ácidos grasos, azúcares, almidones, proteínas, lípidos y otros compuestos como los alcaloides (Sharapin, 2000).

Los resultados de las reacciones se reportan como (+) o (-) para el metabolito de que se trate²³.

1.2.7. Cromatografía

La cromatografía líquida se realiza en columna, o en placa. Al elegir un sistema de cromatografía se debe tener en cuenta solo el tamaño de las columnas y la consideración de estas dimensiones de las columnas para la separación requerida. En la práctica se debe evitar el empirismo en las condiciones preparativas de separación para el aumento de escala e



o (-) para el metabolito de que se trate²³.
Se puede utilizar como una TLC preparativa para el aumento de la velocidad del flujo. En la práctica de separación, no debe tenerse en cuenta la naturaleza de la separación. La elección de las condiciones, tales como la presión y el eluyente, llevan a la selección de los parámetros por métodos teóricos. En la búsqueda de las condiciones de separación se ha introducido para tratar el problema de la sobrecarga. Sin embargo, el fenómeno de

sobrecarga, presente a menudo en separaciones preparativas, hace complicada la predicción de los parámetros cromatográficos. Además, la optimización de una separación debe también tenerse en cuenta si se implica un proceso de elución lineal o no lineal.²⁴

²³ <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/24/analisis-fitoquimico.html>

²⁴ Álvarez cruz Néstor S., Bagué Serrano Ana J., “Tecnología Farmacéutica”

1.2.8. Cromatografía por exclusión de tamaño.

La Sephadex LH – 20 es un medio de cromatografía de líquidos para determinar el tamaño molecular de producto natural tal como esteroides, terpenoides, lípidos, péptidos de bajo peso molecular útil para la escala analítica e industrial para la preparación de las especies moleculares estrechamente relacionados

Es útil tanto en escala estrechamente relacion puede utilizar ya sea d de iones de alto rendim Se caracteriza principa de hidrófilos y lipófilos

1.3. JUSTIFICACIÓN:

La maca es un tubércu destacan las propiedad fecundidad a hombres en este tubérculo den estimulantes sobre la que empresas de prod comercializar diversos

En Bolivia, una de las empresa NATURALCOS que comercializa la harina de maca, tanto como harina tratada (MACA SPIRIT) o como harina concentrada (MACA FORTE). La última se caracteriza por poseer una mayor concentración de metabolitos, debido a la adición de un extracto hidroalcohólico rico en metabolitos extraídos de la harina de maca.

Ya se realizaron muchos estudios de Maca, entre estos muchos acerca de la composición y concentración de los metabolitos primarios y secundarios presentes y de las posibles actividades de los metabolitos aislados. Sin embargo, pocos son los estudios realizados



ración de especies moleculares ico-químicas de este medio, se le pulido mediante intercambio a o como el paso final de pulido. rrafía debido a la naturaleza dual

medicinales, entre las cuales se o que muchos creen que prestan stigación han realizado estudios iedades afrodisíacas y efectos iedades farmacológicas. Por lo terés en esta planta, llegando a

mercialización de la maca es la

de los productos comercializados, en especial en Bolivia (entre ellos los de la empresa de NATURALCOS), que nos indiquen la composición de lo que se comercializa. Por esto, es importante analizar el extracto hidroalcohólico obtenido de la harina de maca en la empresa NATURALCOS para la determinación de los metabolitos extraídos debido a que con esto se puede justificar plenamente la actividad farmacológica de los productos comerciales. Además, es importante ver si el proceso de extracción es el adecuado o se puede mejorar para obtener un extracto de maca más eficiente. Este trabajo está enfocado en el estudio de la actividad farmacológica de los extractos de maca de la empresa NATURALCOS, así como en la comercialización de estos extractos de mediana potencia farmacológica según los estudios realizados en los últimos años.



CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS.

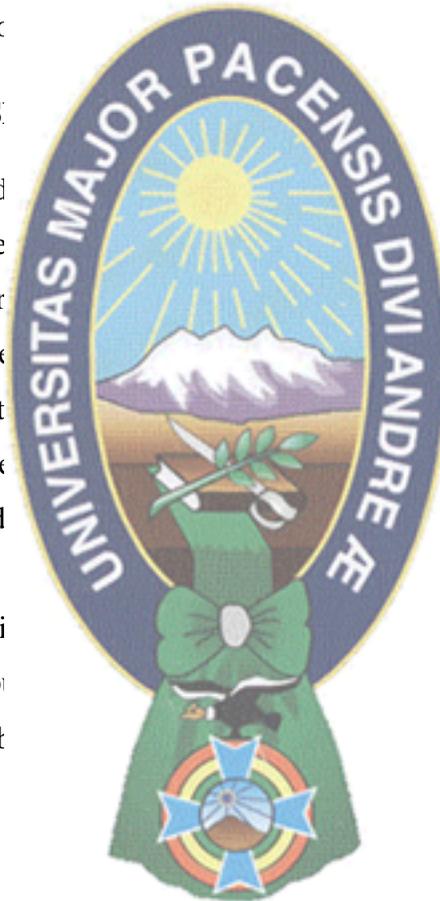
2.1. OBJETIVO GENERAL.

Contribuir a la mejora del proceso de extracción de maca en la empresa NATURALCOS a partir de estudios fito

a.

2.2. OBJETIVOS ES

- Realizar un estudio fitoquímico de maca producido por la empresa NATURALCOS
- Determinar una metodología para la obtención de un extracto hidroalcohólico de maca
- Determinar el tiempo de extracción de un extracto hidroalcohólico de maca
- Realizar un estudio farmacológico, de los compuestos de interés farmacológico, (compuestos fenólicos, terpenos, etc.)
- Realizar una propuesta alternativa de maca a la empresa NATURALCOS



Realizar un estudio fitoquímico de maca producido por la empresa NATURALCOS

a la obtención de un extracto hidroalcohólico de maca

para obtener un extracto hidroalcohólico de maca

de los compuestos de interés farmacológico, (compuestos fenólicos, terpenos, etc.)

alternativa de maca a la empresa NATURALCOS

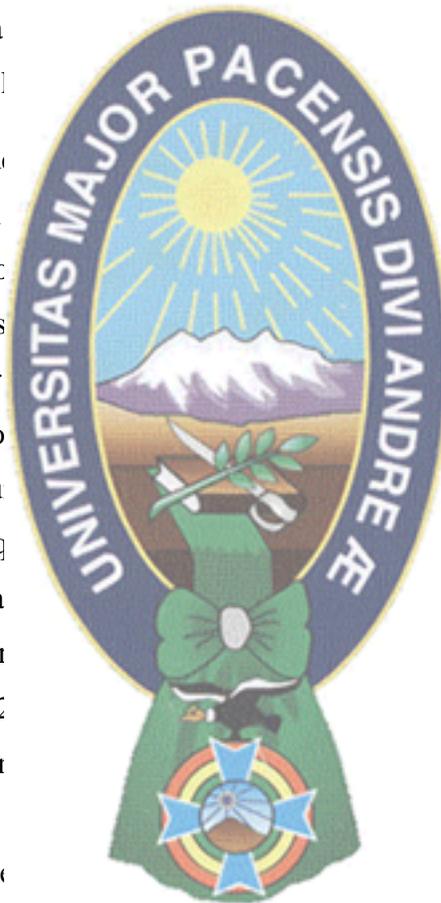
CAPÍTULO 3.

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. MATERIAL VEGETAL EN ESTUDIO.

Para este trabajo se obtuvieron muestras de harina de maca y de extracto hidroalcohólico de maca de la empresa (la planta industrial de la zona de Rio Seco) obtuvieron en enero del 2018 de la empresa (zona Rio Seco)

El extracto y harinas de maca se obtuvieron por personal de la planta industrial de la zona de Rio Seco. Primero se cosechan los tubérculos de la maca en seis meses en parcelas de cultivo. Luego se pasa por un tamiz de alrededor de 100 micras, la harina es calentada con agua para eliminar el almidón y se obtiene un extracto que se debe ser cocido, haciendo que sea más digestible. En el caso de la maca, su sabor es fuerte y asimilable, su sabor se suaviza con una desinfección por ebullición. La maca tratada se seca en un horno a 70°C durante 72 horas. El filtrado tiene un olor fuerte que es apantallado por un olor astringente ligeramente rancio-dulce.



El extracto y harinas de maca se obtuvieron por personal de la planta industrial de la zona de Rio Seco. Primero se cosechan los tubérculos de la maca en seis meses en parcelas de cultivo. Luego se pasa por un tamiz de alrededor de 100 micras, la harina es calentada con agua para eliminar el almidón y se obtiene un extracto que se debe ser cocido, haciendo que sea más digestible. En el caso de la maca, su sabor es fuerte y asimilable, su sabor se suaviza con una desinfección por ebullición. La maca tratada se seca en un horno a 70°C durante 72 horas. El filtrado tiene un olor fuerte que es apantallado por un olor astringente ligeramente rancio-dulce.

3.2. EQUIPOS Y REACTIVOS.

3.2.1. Equipos, Materiales y reactivos.

Tabla 2. Materiales, equipos y reactivos empleados.

Equipos	Materiales	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Lámpara de luz U.V. • Balanza analítica PRECISA XT 120A. • Bomba de vacío. • Rotaevaporador HEIDOLPH. • Estufa. • Liofilizador Alpha 1-2 LD plus. • Campana extractor. • Equipo de RMN. 		<p>agua destilada (H₂O). tanol (C₂H₅OH). etanol (CH₃OH) -Butanol (C₄H₉OH) cetato de Etilo (CH₃COOC₂H₅). cido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). cido clorhídrico (HCl). cido acético glacial (CH₃COOH). anhídrido acético (CH₃CO)₂O. cido pícrico (C₆H₂OH(NO₂)₃). hidróxido de sodio (NaOH) moniaco (NH₃). loruro férrico (FeCl₃). loruro mercuríco (HgCl₂). oduro de potasio (KI). itrato de bismuto (Bi(NO₃)₃). oroformo (CHCl₃). iclorometano (CH₂Cl₂). ulfato cúprico (CuSO₄). artrato de sodio potasio ((KNaC₄H₄O₆·4H₂O)).</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Balones de concentración • de 250, 500 y 5000 mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • Yodo (I₂). • Ninhidrina (C₉H₆O₄). • Gelatina sin sabor. • Cloruro de sodio (NaCl). • Magnesio metálico (Mg).

3.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS.

3.3.1. Estudio fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de maca de NATURALCOS.

3.3.1.1. Secado del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS para la determinación de reactividad

Cinco litros de extracto de maca de la empresa NATURALCOS fueron sometidos al siguiente procedimiento: se redujo el volumen a la mitad, y se agitó a 50 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente y luego con presión reducida. Luego, el extracto acuoso fue sometido a un proceso de liofilización. Para esto, continuamos con el mismo procedimiento que fueron refrigerado a -20 °C. Después de completar el agua, se lió el proceso para el restante.



mpresa NATURALCOS fueron sometidos al siguiente procedimiento: se redujo el volumen a la mitad, y se agitó a 50 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente y luego con presión reducida. Luego, el extracto acuoso fue sometido a un proceso de liofilización. Para esto, continuamos con el mismo procedimiento que fueron refrigerado a -20 °C. Después de completar el agua, se lió el proceso para el restante.

3.3.1.2. Análisis Fitoquímico de NATURALCOS.

Se tomaron alícuotas de 10 mL de extracto de maca de la empresa NATURALCOS y se disuelfen en etanol, agitando a 50 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente y luego con presión reducida. Luego, el extracto acuoso fue sometido a un proceso de liofilización. Para esto, continuamos con el mismo procedimiento que fueron refrigerado a -20 °C. Después de completar el agua, se lió el proceso para el restante.

Extracto hidroalcohólico de maca de NATURALCOS

al tipo de prueba a realizar, se utilizó HCl 0,1 N), o bien se analiza en seco.

Empleando el método de cribado fitoquímico descrito por Locket et al²⁵. Se exponen los extractos a diferentes reactivos, la reacción química subsiguiente se expresa en cambios colorimétricos de la solución que se clasificaran cualitativamente como presencia “+++” (abundante), “++” (moderado), “+” (leve) y “-” (ausente) del metabolito estudiado. A

²⁵ Lock O, Investigación Fitoquímica, Fondo Editorial 2da ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.

continuación, se detallan las pruebas químicas: 1) Reactivo de Mayer, Wagner y Dragendorff para alcaloides; 2) Reactivo de Borntrager para quinonas, 3) Prueba de Fehling para la detección de azúcares reductores, 4) Reactivo de Gelatina al 10% para taninos, 5) Prueba de Ninhidrina al 2% para aminoácidos libres, 6) Prueba de espuma para saponinas, 7) Prueba de antocinidinas para Antocinidinas. 8) Prueba de Shinoda para flavonoides, 9) Reactivo de Cloruro férrico al 5% y acetato de plomo para fenoles, 10) Ensayo de Lieberman-Blanchard para lactonas y cumarinas y 11) Prueba de Baljet para

Para los filtrados ácidos se agregaron 10 ml de ácido clorhídrico diluido (HCl 10%). Luego se filtró y se conservó el filtrado.

Para los filtrados acuosos se agregaron 12 ml de agua destilada, se calienta a ebullición y se conservó el filtrado.

Para los filtrados etánicos se agregaron 8 ml de etanol y se conservó el filtrado.

a) Alcaloides

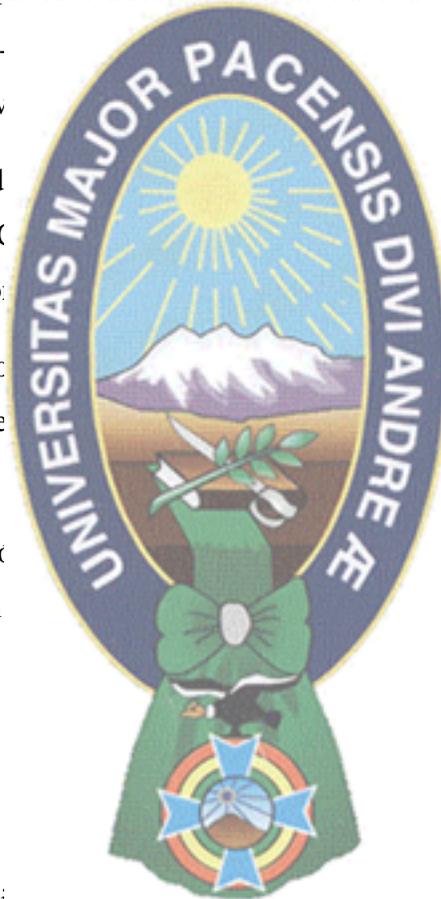
Test de Meyer.

A 2 mL del filtrado ácido, se añaden una o dos gotas del reactivo de Meyer por las paredes del tubo de ensayo. Un precipitado blanco o crema indica que el test es positivo.

Reactivo de Meyer.

Cloruro mercuríco (HgCl_2 ; 0,40 g) es disuelto en 15 mL de agua y yoduro de potasio (KI; 1,25 g) es disuelto en 2,5 mL de agua. Las dos soluciones se mezclan y se aforan a 50 mL con agua.

Test de Wagner.



les se agregaron 10 ml de ácido clorhídrico diluido (HCl 10%) y se agita.

les se agregaron 12 ml de agua destilada, se calienta a ebullición y se agita. Luego se filtró y se conservó el filtrado.

les se agregaron 8 ml de etanol y se conservó el filtrado.

A 2 mL del filtrado ácido, se le añaden unas cuantas gotas del reactivo de Wagner por las paredes del tubo de ensayo. Una coloración parda-rojiza indica que el test es positivo.

Reactivo de Wagner.

Yodo (I_2 ; 0,30 g) y yoduro de potasio (KI; 0,25 g) disueltos y aforados a 25 mL con agua destilada.

Test de Dragendorff.

A 3 mL del filtrado ácido se añaden unas cuantas gotas por las paredes del tubo de ensayo. Un precipitado rojizo indica que el test es positivo.

Reactivo de Dragendorff.

Solución A. Nitrato de mercurio (II) 1 g en 40 mL de agua bajo caudal.

Solución B. Yoduro de mercurio (II) 1 g en 40 mL de agua destilada.

b) Test para Quinona

Test de Borntrager.

A 2 mL de hidrolizado se añaden unas cuantas gotas de fase orgánica es separada. Una coloración rosa indica que el test es positivo.

c) Test de Azucares Reductores.

Test de Fehling.

A 1 mL de filtrado acuoso es hervido en un baño de agua con 1 mL de cada solución de Fehling (A y B). Un precipitado rojo indica la presencia de azucares.

Reactivo de Fehling.



mezcla de la solución A y B (1:1) por las paredes del tubo de ensayo. Un precipitado rojizo indica que el test es positivo.

10 mL de ácido acético glacial y 10 mL de agua destilada.

10 mL de diclorometano y se agita, la fase orgánica se separa. Una coloración rosa indica que el test es positivo.

Solución A: Sulfato cúprico (CuSO_4 ; 1,73 g) disuelto en 25 mL de agua destilada.

Solución B: Tartrato de sodio-potasio (8,65 g) e hidróxido de sodio (NaOH ; 2,5g) disueltos en 25 mL de agua destilada.

d) Test de Aminoácidos Libres.

Test de Ninhidrina.

2 gotas de solución de
2 mL de filtrado acuoso

ml de acetona), son añadidos a
ncia de aminoácidos.

e) Test de Taninos.

Test de gelatina.

A 5 mL de solución acuosa
un 10 % de cloruro de

al 1 % de gelatina conteniendo
o indica la presencia de taninos.

f) Test de Saponinas.

Test de Espuma.

5 mL de solución acuosa
columna de 2 cm de espesor

Se y se deja reposar 15 min. Una
nas.

g) Test de compuesto

Test de cloruro férrico.

A 3 mL de filtrado etanólico, se le añaden algunas gotas de cloruro férrico 5 % (neutro).
Un color verde oscuro, azul, azul oscuro indica la presencia de polifenoles.

Test de acetato plumboso.

A 5 mL del filtrado acuoso se le añade 3 mL de solución de acetato de plomo al 10 %. Un
precipitado blanco y voluminoso indica la presencia de compuestos fenólicos.



h) Test de Antocianidinas.

A 1 mL de filtrado etanolico, se le añade solución de ácido clorhídrico al 0,1 M (HCl) hasta pH 3-4 y luego se basifica a pH 8-9 con solución de hidróxido de sodio 0,1 M (NaOH). El cambio de color rojo en medio ácido a otro en medio básico, indica la presencia de antocianidinas.

i) Test para flavonoíd

Test de Shinoda.

A 3 mL de filtrado etanolico, se añaden 2 gotas de solución de cloruro de magnesio, seguidos de ácido clorhídrico al 0,1 M. Una reacción anaranjada, rosa, roja o púrpura indica la presencia de flavonoides.

j) Test para Triterpenos

Test de Lieberman-B

A 20 mg de extracto de la muestra se añaden 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, formando un conjunto de cambios de color.

Reactivo de Lieberman

Se mezcla 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo (CHCl₃) y se enfría a 0°C. Luego se añaden 2 gotas de la muestra y se agita.

k) Prueba para lactonas y cumarinas volátiles.

Test de Baljet.

Combinar las soluciones 1 y 2 (1:1) antes de usar 2 a 3 gotas a 2 a 3 mg de extracto. La reacción es positiva si se observa un color rojo intenso.

Reactivo de Baljet.

Solución 1. 0,20 g de ácido pícrico (C₆H₂OH(NO₂)₃) en 20 mL de etanol.



mentos de magnesio metálico, reacción anaranjada, rosa, roja o púrpura indica la presencia de flavonoides.

o de Lieberman-Burchard. Un conjunto de cambios de color indica la presencia de Triterpenos/Esteroides.

on 1 mL de cloroformo (CHCl₃) y se enfría a 0°C. Luego se añaden 2 gotas de la muestra y se agita.

Solución 2. 2,00 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 20 mL de agua destilada.

3.3.2. Determinación de condiciones de extracción adecuadas para la obtención de un extracto hidroalcohólico de harina de maca.

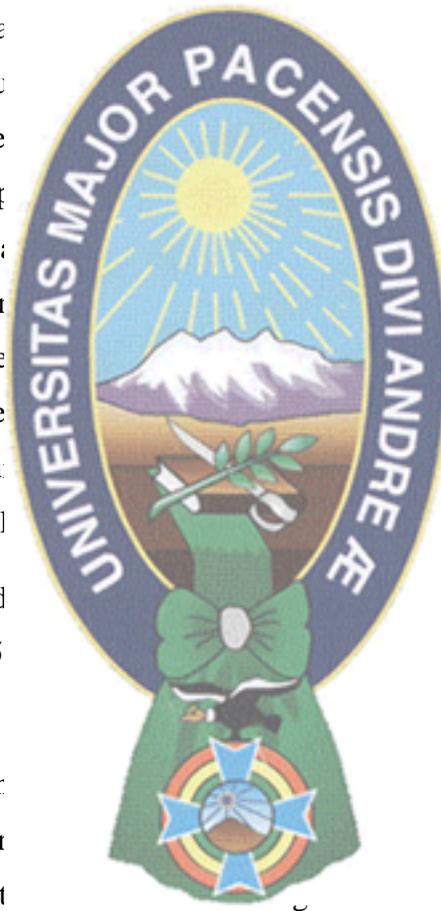
3.3.2.1. Determinación de la relación etanol/agua del solvente de extracción.

Se pesaron 10 g de harina de maca y se le adicionó 100 mL de solvente (relación solvente/harina de maca: 10:1). Se agitó a 30 rpm, primero con presión normal y luego con presión total hasta que se redujera su volumen a la mitad. Se trasladó a vasos plásticos previamente lavados con agua destilada. Después del paso anterior, para determinar los rendimientos, que es una muestra a ser utilizada en el siguiente experimento.

Los solventes empleados fueron: etanol/agua: 100:0, 75:25 por triplicado.

Luego, para determinar los rendimientos obtenidos con los diferentes extractos, tomando estas muestras se tomaron alícuotas de los extractos secos y en función al tipo de prueba a realizar, se disuelven en etanol, agua, solución de ácido clorhídrico (HCl 0,1 N), o bien se analiza en seco, siguiendo el mismo procedimiento empleado en el Análisis Fitoquímico Preliminar del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS.

Finalmente, se contrastaron los resultados obtenidos en los rendimientos de extracción en función de la variación de solvente con los resultados del estudio fitoquímico preliminar de cada



que se le adiciono 100 mL de solvente (relación solvente/harina de maca: 10:1). Se agitó a 30 rpm, primero con presión normal y luego con presión total hasta que se redujera su volumen a la mitad. Se trasladó a vasos plásticos previamente lavados con agua destilada. Después del paso anterior, para determinar los rendimientos, que es una muestra a ser utilizada en el siguiente experimento.

Los solventes empleados fueron: etanol/agua: 100:0, 75:25 por triplicado.

Luego, para determinar los rendimientos obtenidos con los diferentes extractos, tomando estas muestras se tomaron alícuotas de los extractos secos y en función al tipo de prueba a realizar, se disuelven en etanol, agua, solución de ácido clorhídrico (HCl 0,1 N), o bien se analiza en seco, siguiendo el mismo procedimiento empleado en el Análisis Fitoquímico Preliminar del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS.

extracto. Para la determinación del solvente adecuado para la obtención de un extracto hidroalcohólico rico en compuestos de interés farmacológico.

3.3.2.2. Determinación de tiempo de maceración adecuado.

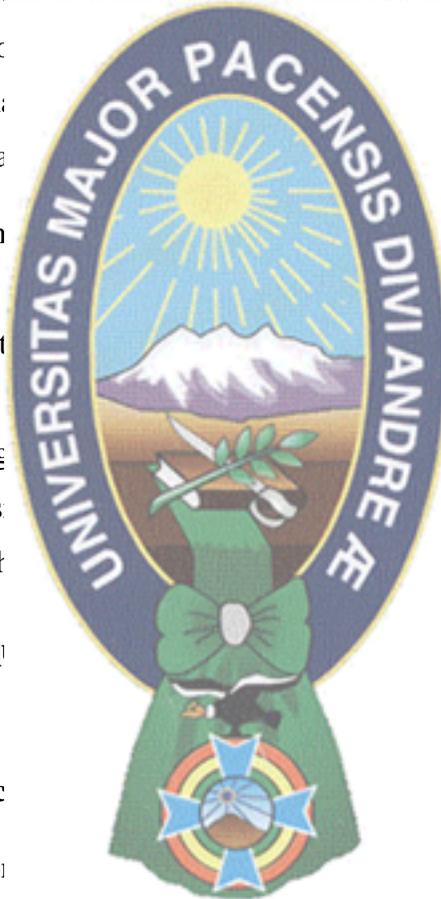
Después de determinar el solvente óptimo para la extracción, se evaluó el tiempo de maceración. Para lo cual se repite el proceso anterior para la selección del solvente de maceración cambiando el tiempo de extracción y empleando el solvente previamente seleccionado. Los extractos se iniciaron a las 8:00 am.

Para determinar la concentración de los diferentes tiempos de extracción, se tomaron alícuotas de los extractos, se disuelven en etanol, agitando hasta secar, siguiendo el mismo procedimiento del extracto hidroalcohólico.

3.3.3. Estudio fitoquímico y farmacológico.

3.3.3.1. Análisis por cromatografía

En búsqueda de un compuesto de interés farmacológico, se realizó un análisis cualitativo y semicuantitativo de muestras de la empresa, se utiliza la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). Para esto se utiliza placas de sílica gel 60 F254 de 5 cm de altura, marcando a medio centímetro del borde inferior y superior la línea del sembrado y el frente del disolvente (respectivamente). Para el sembrado del extracto, se disuelven 0.5 g de extracto en 2 mL del respectivo solvente de extracción, luego se deja en estufa a 45 °C durante 15 minutos. Con un tubo capilar, se toma la muestra preparada y se coloca una pequeña cantidad en la línea del sembrado. Antes del realizado de la cromatografía, se vierte el eluyente en la



extracción y empleando el solvente de extracción por 3 días. Todos los extractos se tratan por triplicado.

En los extractos obtenidos con el tiempo de extracción se realizó un análisis fitoquímico preliminar de los extractos para determinar el tipo de prueba a realizar, se utilizó el método de prueba con HCl 0,1 N), o bien se analiza en análisis Fitoquímico Preliminar

1 de compuesto de interés

En cualitativa y semicuantitativa

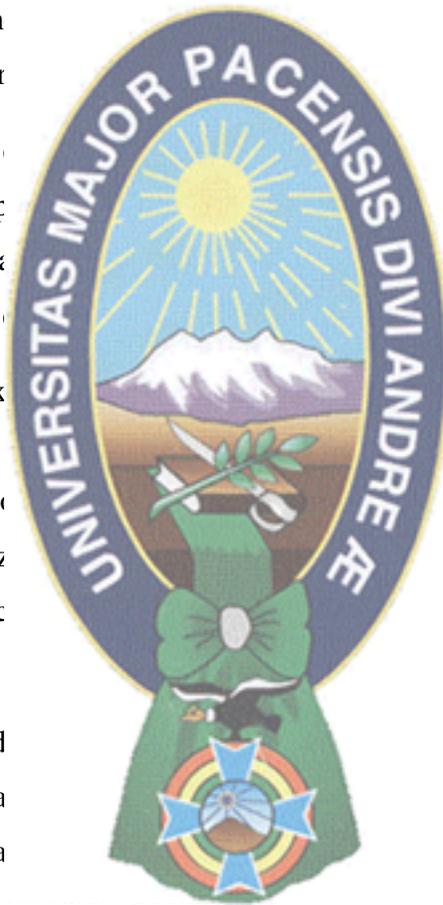
3.3.3.3. Separación por columna VLC.

Se utiliza una columna corta de pírex provisto con una placa de vidrio sinterizado, que se llena poco a poco en seco con silica gel de TLC (silica gel 60 F₂₅₄). El adsorbente se deposita bajo gravedad dando ligeros golpecitos para que la distribución sea homogénea. Luego se aplica vacío y se comprime el adsorbente presionando con bases planas y dando golpecitos hasta obtener una altura de 5 cm.

Nuevamente se libera el disolvente de baja polaridad. Cuando el disolvente está preparada para la

Para la siembra del extracto soportado del extracto cantidad de solvente por en un mortero. Una vez del pilón hasta que el c horas.

Se esparce la cabeza de columna y se realiza la con el de baja polaridad la columna entre cada



bre la superficie del adsorbente luego se aplica de nuevo vacío. a, se seca, entonces la columna

de columna. Que consiste en el disuelve el extracto en la menor or goteo a la silica gel granulada geniza con la silica con la ayuda eja en estufa a 45 °C durante 16

superficie del absorbente de la 200 mL de solvente empezando claridad, haciendo que se seque

3.3.3.4. Separación por columna Sephadex LH-20.

A la fracción en estudio, se le adiciona 5 mL etanol de 96° y se lleva a estufa a 45 °C durante 15 minutos. Una vez disuelto, se enfría a temperatura ambiente y se procede al sembrado en la columna sephadex LH-20. La cromatografía se realiza usando etanol de 96° como eluente.

CAPÍTULO 4.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES.

4.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE MACA DE NATURALCOS.

4.1.1. Secado del extracto de maca de naturalcos para la determinación de rendimiento de extracto

Al realizar el secado por rotavaporador, se tuvieron cambios de temperatura y de presión, causando la pérdida de muestra. El equipo de rotavaporador no era adecuado por lo que para evitar la pérdida de muestra se tuvo que bajar la presión. Al realizar esto se eliminó gran parte del etanol se asume que es igual a 5 kg de harina de maca gelatinizada



4.1.1.1. Secado del extracto de maca de naturalcos para la determinación de rendimiento de extracto

Al realizar el secado por rotavaporador, se tuvieron cambios de temperatura y de presión, causando la pérdida de muestra. El equipo de rotavaporador no era adecuado por lo que para evitar la pérdida de muestra se tuvo que bajar la presión. Al realizar esto se eliminó gran parte del etanol se asume que es igual a 5 kg de harina de maca gelatinizada

Tabla 3. Masa total

Masa de harina de Maca	Volumen de extracto	Masa del recipiente [g]	Masa del recipiente y muestra seca [g]	Masa de la muestra seca [g]
2500,00g	2,5 L	5,0690	251,9000	246,8310
2500,00g	2,5 L	5,0145	247,7000	242,6855
Total [g]				489,5165
Rendimiento [%, m/m]				9,7903

4.1.2. Análisis Fitoquímico Preliminar del extracto hidroalcohólico de NATURALCOS.

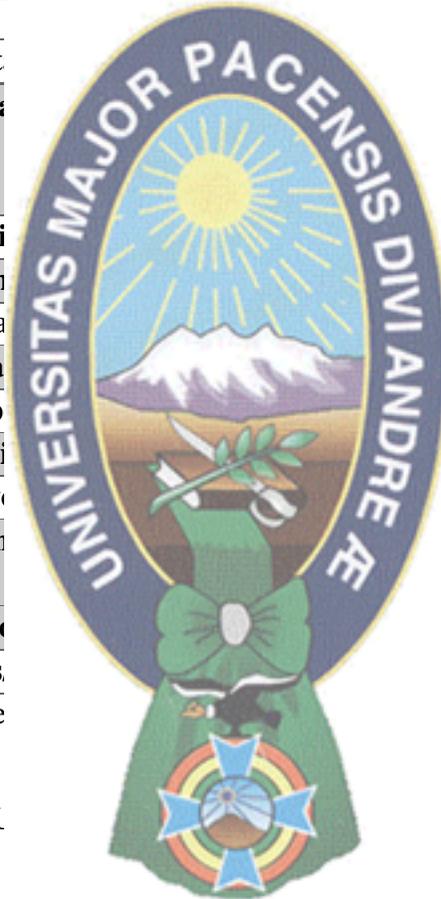
Los resultados de las pruebas fitoquímicas para la muestra el extracto de NATURALCOS son los siguientes:

Tabla 4. Pruebas fitoquímicas realizadas al extracto hidroalcohólico de NATURALCOS

Met	NATU
Alca	++
	++
	++
Qui	-
Amin	-
Azuca	++
Ta	-
Sap	+
Antoci	-
Flavo	-
Fer	-
	++
Triterpeno	+++
Lactonas	+++

Leyenda: (+++) Pre

erada, (+) Presencia leve, (-)



El extracto de NATU saponinas, moderada reductores, y muy intenso para Triterpenos/Esteroides y Lactonas/Cumarinas. Es necesario mencionar que las pruebas para quinonas, aminoácidos, antocianidinas, flavonoides y fenólicos (para Cloruro férrico), fueron negativas, lo cual puede deberse a muy bajas concentraciones de estos en el extracto.

4.2. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ADECUADAS PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HARINA DE MACA.

4.2.1. Determinación de la relación etanol/agua del solvente de extracción.

Los extractos obtenidos en el laboratorio no fueron iniciados al mismo tiempo, sino a intervalos de uno a dos días, para que se maculasen y dificulten su secado. Este no presentó dificultades, las fueron las siguientes:

Tabla 5. Masas y rendimientos obtenidos en el laboratorio donde se varió la relación de extracción.

Solvente [etanol/agua]	N	masa [g]	masa [g]	masa [g]	Promedio del rendimiento y Desviación estándar [%]
0/100	2			26	29,5097 ± 3,6514
	3			24	
	4			43	
25/75	5			22	44,2519 ± 3,3095
	6			45	
	7			89	
75/25	8			35	Dato eliminado
	9			73	34,3501 ± 3,9213
	10			29	
50/50	11			72	41,3612 ± 2,7979
	12	10,0017	4,3221	43,2137	
	13	10,0035	3,8156	38,1427	
100/0 (96/4)	14	10,0040	2,387	23,8605	Dato eliminado
	15	10,0000	1,3163	13,1630	13,6477 ± 0,6855
	16	10,0018	1,4135	14,1325	

Como se puede apreciar en la tabla 5, los solventes que presentan mayor rendimiento son los que tienen mezclas hidroalcohólicas. Como la mezcla de etanol/agua de relación 25/75,

50/50 y 75/25 (rendimientos de 44,75, 41,36 y 34,35 %, respectivamente). En función a estas concentraciones en el solvente de extracción, se asume que la polaridad de los metabolitos extraídos es media a medianamente alta, y los compuestos que podrían ser extraídos son compuestos glicosilados o de alta funcionalización como taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides y algunos metabolitos primarios. El extracto en el que se empleó netamente agua, al tener una polaridad mayor que la de las mezclas hidroalcohólicas, se espera que tenga mayor polaridad que los compuestos de una polaridad media alta. Por otro lado, el extracto en el que se empleó etanol 75/25 tuvo, debido a que es un solvente de polaridad media, el menor rendimiento de metabolitos. Este solvente es el que generalmente se utiliza para extraer metabolitos de media polaridad, así el extracto en el que se empleó etanol 50/50 tuvo el mayor rendimiento de compuestos.

Los resultados de las extracciones en distintos solventes son



El extracto en el que se empleó netamente agua, al tener una polaridad mayor que la de las mezclas hidroalcohólicas, se espera que tenga mayor polaridad que los compuestos de una polaridad media alta. Por otro lado, el extracto en el que se empleó etanol 75/25 tuvo, debido a que es un solvente de polaridad media, el menor rendimiento de metabolitos. Este solvente es el que generalmente se utiliza para extraer metabolitos de media polaridad, así el extracto en el que se empleó etanol 50/50 tuvo el mayor rendimiento de compuestos.

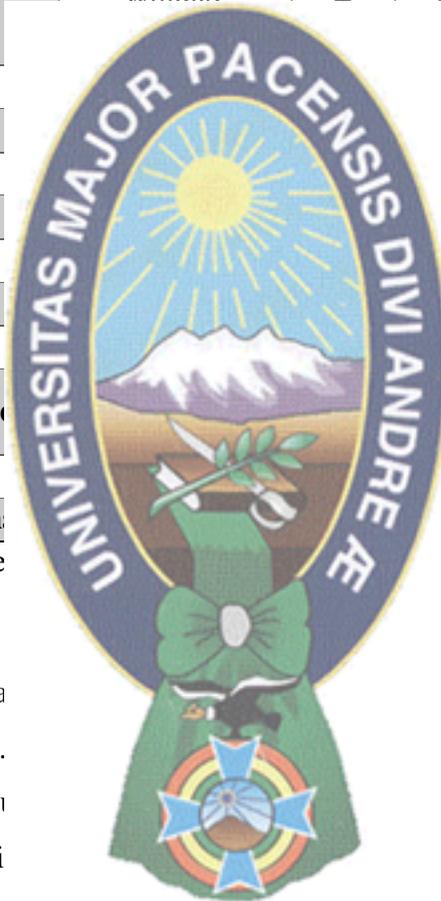
Tabla 6. Pruebas fitoquímicas realizadas a los extractos obtenidos variando la relación de Etanol/agua en el solvente de extracción (0:100), (25:75), (50:50), (75:25) y 15 (96:4).

Metabolito	Test	0:100	25:75	50:50	75:25	96:4
Alcaloides	Meyer	+	+	++	+	+
	Wagner	+	+	++	++	+
Quinonas				-	-	-
Azucres Red.			+	++	++	+
Aminoácidos				-	-	-
Taninos				++	++	+++
Saponinas		+	-	-	-	+
Antocianidinas				-	-	-
Flavonoides				-	-	-
Triterpenos/Esteroides				++	++	+++
Fenólicos				-	-	+
Lactonas/Cumarinas		+	+++	+++	+++	+++

Leyenda: (+++) Presencia abundante, (++) Presencia moderada, (+) Presencia leve, (-) Ausencia

erada, (+) Presencia leve, (-)

La muestra de etanol/agua con una relación de 15:1 (96:4) extrajo mayor cantidad de metabolitos. Se extrajeron azúcares, saponinas y lactonas/cumarinas. Como el solvente era altamente polar, se extrajeron mayor cantidad de azúcares, saponinas y lactonas/cumarinas. Por otra parte, como ya se mencionó, se aprecian saponinas y lactonas/cumarinas. Que debido a su estructura (y por ende polaridad) es factible que sean extraídos con agua.



La muestra de etanol/agua con una relación de 15:1 (96:4) extrajo mayor cantidad de metabolitos. Se extrajeron azúcares, saponinas y lactonas/cumarinas. Como el solvente era altamente polar, se extrajeron mayor cantidad de azúcares, saponinas y lactonas/cumarinas. Por otra parte, como ya se mencionó, se aprecian saponinas y lactonas/cumarinas. Que debido a su estructura (y por ende polaridad) es factible que sean extraídos con agua.

Para la muestra de etanol/agua (25:75), se dan casi los mismos resultados. En Dragendorff, espumas y Baljet aumenta la presencia. Por otro lado, disminuye en Fehling. Otra vez, este resultado era esperado. Porque al adicionar etanol, disminuimos levemente la polaridad de la mezcla. Haciendo que la cantidad de compuestos polares como los azúcares disminuya y aumenten otros que son menos polares (como saponinas y lactonas/cumarinas). También se observa el positivo para la prueba de Liebermann-Burchard para Triterpenos o esteroides glicosilados.

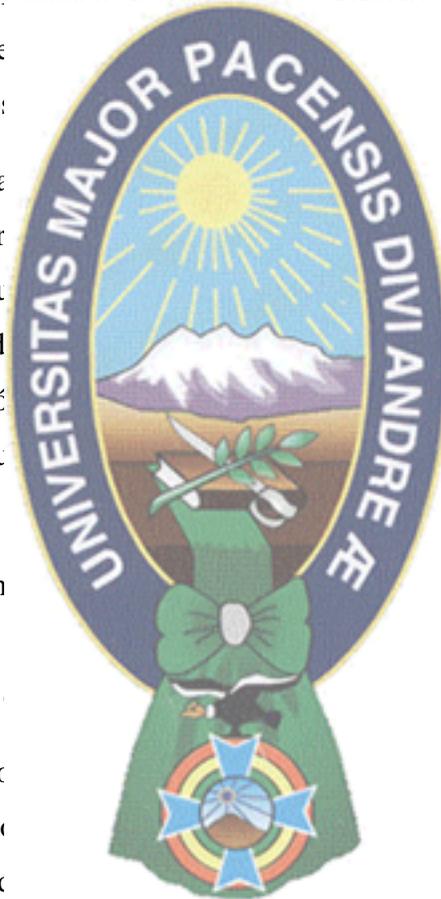
La muestra de etanol/agua en los test de Wagner muestra anterior). Aumenta la presencia de taninos porque la concentración que probablemente hubo taninos.

Para la muestra de etanol anterior, a excepción de alcaloides, mayor a la

En la muestra de etanol cantidad de metabolitos todos los test realizados

abundancia en los test de Triterpenos/Esteroides y Lactonas/Cumarinas. Pero el resultado más interesante se dio en el test de los fenólicos con cloruro férrico, ya que fue el único de todas las muestras tratadas que dio indicio de positivo, lo que indica que para este tipo de compuestos se requiere solventes menos polares.

Un aspecto que se debe recalcar es, que en todos los análisis realizados no se observó la presencia de quinonas, aminoácidos libres, antocianidinas ni flavonoides. Esto no



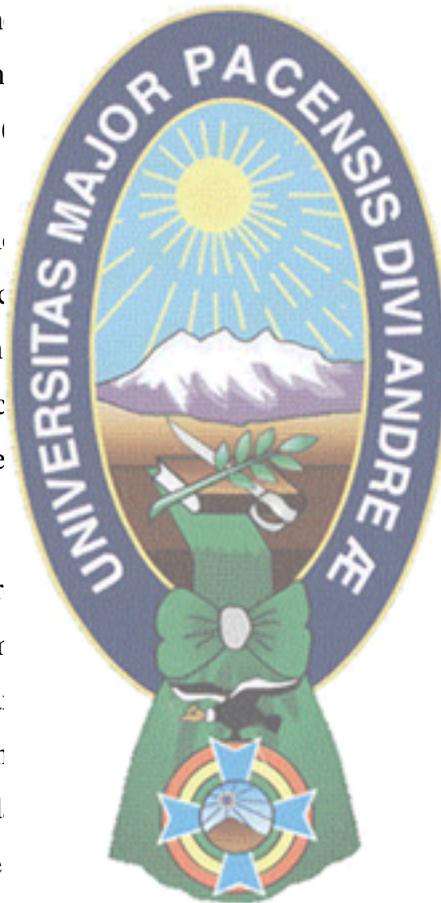
alcaloides, con mayor presencia positiva para azúcares (como la Triterpenos/Esteroides. Y también almente se da un caso interesante, parece, esto no es lógico por lo que yo y extrae buena cantidad de taninos. En la muestra anterior se observó una presencia moderada de taninos (25)

Se observó que es la que extrae mayor cantidad de taninos. Se presentaron una presencia leve en los test de Fehling y de espuma. Presentó

significa que la planta de maca no los tenga, sino que no están o están en una cantidad muy baja en el extracto hidroalcohólico estudiado.

Evaluando en función a los metabolitos extraídos y de qué tipo son, se podría emplear mezclas de una concentración de etanol/agua de 50:50 a etanol de 96°. Las concentraciones que contienen menor cantidad de etanol (50:50 y 25:75) si bien tienen buenas concentraciones (posiblemente macaen compuestos fenólicos) de 96° tiene una leve generación de ciertos compuestos. Si bien se puede buscar el proceso de extracción. Lastimosamente esto es lo que buscando obtener una relación de etanol/agua 75/25.

El solvente de mayor cantidad de agua, la muestra una polaridad relativa segundo mejor rendimiento. El mismo resultado se obtuvo solo agua como solvente no se obtuvo un buen rendimiento ni una gran cantidad de metabolitos identificados. Por último, la que mayor cantidad de metabolitos extrajo fue en la que solo se usó etanol, pero es la que más bajo rendimiento tuvo. En busca de del equilibrio entre rendimiento y cantidad de metabolitos extraídos, la mejor mezcla es la de etanol/agua 75:25.



penos/Esteroides y alcaloides beneficiosos, tienen un déficit de extracto que se obtuvo con etanol que arrastra moléculas que pueden complicar el proceso de extracción. Si bien se puede buscar el proceso de extracción. Lastimosamente esto es lo que buscando obtener una relación de etanol/agua 75/25. El solvente de mayor cantidad de agua, la muestra una polaridad relativa segundo mejor rendimiento. El mismo resultado se obtuvo solo agua como solvente no se obtuvo un buen rendimiento ni una gran cantidad de metabolitos identificados. Por último, la que mayor cantidad de metabolitos extrajo fue en la que solo se usó etanol, pero es la que más bajo rendimiento tuvo. En busca de del equilibrio entre rendimiento y cantidad de metabolitos extraídos, la mejor mezcla es la de etanol/agua 75:25.

4.2.2. Determinación de tiempo de maceración adecuado.

Los extractos obtenidos en el laboratorio fueron iniciados al mismo tiempo, en búsqueda de la mayor semejanza posible en las condiciones de extracción, empleando el solvente de etanol/agua 75:25. Los extractos al momento de ser secados no presentaron dificultades, por lo que las masas obtenidas fueron las siguientes:

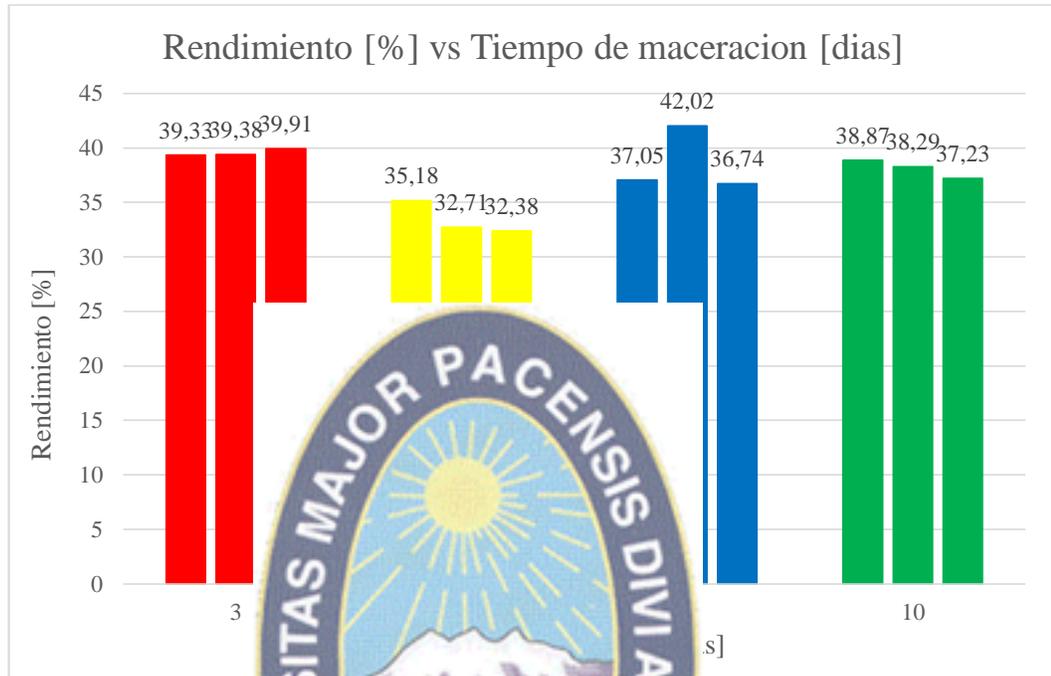
Tabla 7. Masas c
hidroalcohol:

Tiempo de maceración [días]	N
3	28
	27
	26
5	25
	24
	23
7	22
	21
	20
10	19
	18
	17



lo como solvente solución
tiempo de maceración.

limiento [%]	Promedio del rendimiento y Desviación estándar [%]
0,3275	39,5382 ± 0,3206
0,3800	
0,9071	
5,1837	33,4258 ± 1,5312
2,7111	
2,3827	
7,0506	38,6040 ± 2,9632
2,0209	
5,7406	
3,8669	38,1302 ± 0,8276
8,289	
7,2347	



Gráfica 1. Rendimiento de extracción agrupados en días de maceración

Como se puede observar en el gráfico, existen grandes variaciones en el rendimiento de extracción. Se da un carácter más variable en el macerado de 3 días, que en el macerado por 10 días. La coloración de todos los extractos es similar, siendo un color amarillento pálido.

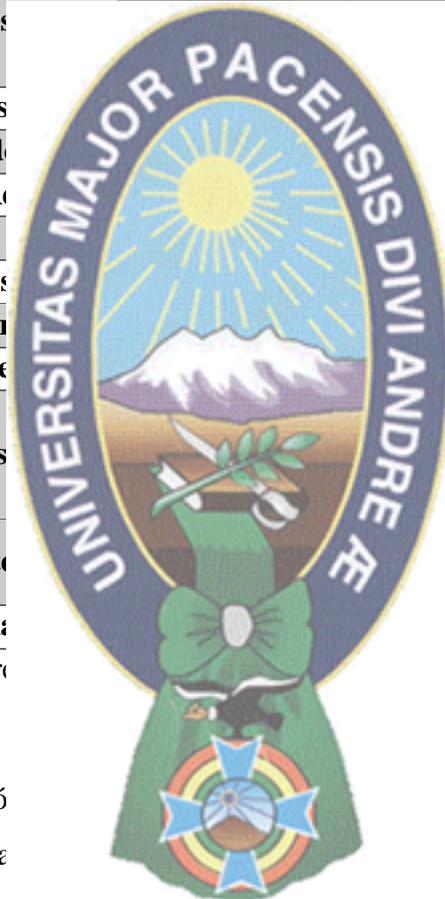
Los resultados de las pruebas fitoquímicas para las muestras de laboratorio empleando distintos tiempos de maceración son los siguientes:

Como se puede observar en el gráfico, existen grandes variaciones en el rendimiento de extracción. Se da un carácter más variable en el macerado de 3 días, que en el macerado por 10 días. La coloración de todos los extractos es similar, siendo un color amarillento pálido.

Los resultados de las pruebas fitoquímicas para las muestras de laboratorio empleando distintos tiempos de maceración son los siguientes:

Tabla 8. Pruebas fitoquímicas realizadas a los extractos de laboratorio en las que se usó como solvente la mezcla etanol/agua 75:25 macerado a distintos tiempos

Metabolito	Test	3 días	5 días	7 días	10 días
	<i>Meyer</i>	+	+	+	+
Alcaloides			+	+	+
Quinonas			-	-	-
Aminoácidos			-	-	-
Azúcares Reductores			++	++	+++
Taninos			-	-	-
Saponinas			-	-	-
Antocianidinas			-	-	-
Flavonoides			-	-	-
Fenólicos			++	++	++
Triterpenos/Esteroides			+++	+++	+++
Lactonas/Cumarinas			++	++	++



. Leyenda: (+++) Presencia

moderada, (+) Presencia leve, (-)

Como ya se mencionó en el apartado de metodología, se obtuvieron resultados positivos para los tests de alcaloides, taninos y lactonas/cumarinas. A continuación, se describe más detalladamente los resultados

obtenidos. Como se mencionó en el apartado de metodología, se espera que se obtengan resultados positivos para los tests de taninos, Triterpenos/Esteroides

Todos los extractos obtenidos con la mezcla etanol/agua 75:25 macerados a diferentes tiempos reportaron presencia leve para las pruebas de alcaloides (Meyer, Wagner y Dragendorff), moderada para fenólicos y Lactonas/Cumarinas (por acetato plumboso y Baljet, respectivamente). También se tiene una presencia intensa para Triterpenos/Esteroides. Los extractos de 3, 5 y 7 días de maceración reportan una presencia moderada de azúcares reductores. La de 10 días de maceración tiene una mayor

presencia que los anteriores extractos. También cabe notar que la extracción por 3 y 10 días reportaron un nuevo resultado, la presencia de saponinas, que anteriormente era negativa. La prueba de taninos (gelatina) que era moderada en el anterior análisis fitoquímico, dio negativo para todos los tiempos de maceración. Se verificó este resultado repetidas veces hasta comprobar que el nuevo análisis era reproducible. Por último, es necesario mencionar que las pruebas para quinonas, aminoácidos, antocianidinas, flavonoides y fenólico son negativas.

En la siguiente tabla se muestra la concentración del sol en los resultados del extracto y los resultados obtenidos.



En los resultados de la variación de la concentración del sol. También se adicionará los resultados para comparación con los últimos resultados obtenidos.

Tabla 9. Rendimientos y pruebas fitoquímicas de los extractos obtenidos con la variación del tiempo de maceración empleando el solvente de etanol/agua 75:25.

Tiempo de maceración	3 días	5 días	7 días	10 días	NATU
Rendimiento [%]	39,5382 ± 0,3206	33,4582 ± 1,5312	38,6040 ± 2,9632	38,1302 ± 0,8276	9,7903
Alcaloides (M)			+	+	++
Alcaloides (W)			+	+	++
Alcaloides (Dra)			+	+	++
Quinonas (Bor)			-	-	-
Aminoáci (Ninhidri)			-	-	-
Azucares red. (S)			++	+++	++
Taninos (Gel)			-	-	-
Saponinas (Es)			-	-	+
Antocianid			-	-	-
Flavonoides (S)			-	-	-
Fenólicos (Cl férico)			-	-	-
Fenólicos (A plumbos)			++	++	++
Triterpenos/Es (Lieberman-Bu)			+++	+++	+++
Lactonas/Cun (Baljet)			++	++	+++

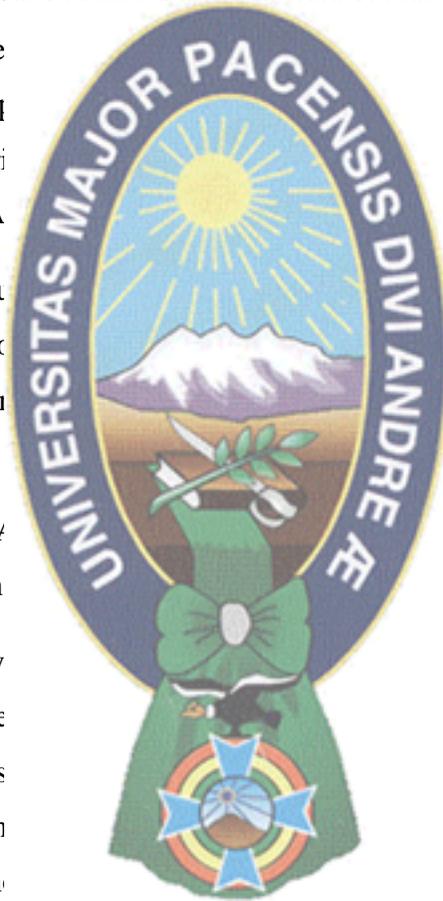
Leyenda: (+++) Pre

erada, (+) Presencia leve, (-)



De los macerados obtenidos a nivel laboratorio, 3 dieron positivos para 7 pruebas fitoquímicas (macerados de 5, 7, y 10 días). Los dos restantes dieron positivos para 8 pruebas (macerado de 3 días y extracto de NATURALCOS). Cabe recalcar que en las pruebas de alcaloides y de Lactonas/Cumarinas el extracto proporcionado por la empresa tiene una mayor abundancia que el extracto obtenido en laboratorio, el resto de las pruebas tienen el mismo resultado.

Según los reportes bibliográficos, los macaenos y macamidas, glucosinolatos, alcaloides, ésteres de ácidos grasos y fitoesteroles son los principales metabolitos secundarios de la maca. Los resultados de los extractos de NATURALCOS y de laboratorio concuerdan con la revisión bibliográfica. Se demostró presencia de alcaloides (y posiblemente macaenos y macamidas) con los test de Meyer, Wagner y Dragendorff. Posiblemente glucosinolatos con Fehling. Fitoesteroles (Triterpenos/Esteroides) con Lieberman-Burchard. También se reporta presencia de...
Por último, se reporta...
no así con cloruro férrico...
y en el extracto de NATURALCOS...
Los rendimientos y pruebas...
los extractos macerados...
para una prueba (saponificación)...
El extracto de 3 días...
proporcionado por NATURALCOS...
extractos obtenidos en...
Por último, se concluye...
75:25 y el tiempo de...
rendimiento y composición...
afectar mucho la composición...
macerado por meses no...
un proceso de degradación en los meses de maceración, aunque estos meses se podrían reducir a solo días.



Las pruebas que mayor presencia dieron fueron las de azúcares reductores, Triterpenos/Esteroides y Lactonas/Cumarinas. Es conveniente enfocarse a analizar estos grupos de metabolitos ya que en los extractos de maca (de la empresa y el laboratorio) son los que pueden proporcionar un mayor valor agregado.

4.3. ESTUDIO FITOQUÍMICO DIRIGIDO A LA OBTENCIÓN DE COMPUESTO DE INTERÉS FARMACOLÓGICO.

4.3.1. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC).

El análisis inicial del extracto hidroalcohólico obtenido se realizó mediante TLC. Las placas obtenidas son las siguientes:



Figura 16. Placas cromatográficas TLC del extracto hidroalcohólico de la empresa NATURALCOS tratados con diferentes eluentes y revelado con ácido sulfúrico al 5%.

La numeración asignada es la siguiente 1) Acetato de etilo, 2) acetona, 3)

diclorometano/metanol (9:1), 4) diclorometano, 5) etanol (96°), 6) acetato de etilo/metanol (1:1), 7) acetato de etilo/metanol/agua (5:5:1), 8) acetato de etilo/metanol (9:1), 9) acetato de etilo/metanol (3:1) y 10) butanol/ácido acético/agua (6:1,5:2,5).

De todas los eluentes tratados se seleccionó las mezclas de acetato de etilo/metanol (9:1) y butanol/ácido acético/agua (6:1,5:2,5). El primero muestra R_f que pueden utilizarse para separaciones de metabolitos mediante columna con soporte de silica. La polaridad de esta mezcla es la adecuada para columnas mezclas con otras hay menor resolución. La cantidad de metanol y la parte de silica y además, el segundo se utiliza para la separación. Esta mezcla se emplea para la separación de los metabolitos.

4.3.2. Extracción de metabolitos

Para la obtención de los extractos se utilizó el material de la empresa NATURALCOS, el cual fue pulverizado y liofilizado. La polaridad, ya que, por lo tanto, con este tipo de solventes se puede utilizar para la separación de los metabolitos.

Las pruebas se realizaron con 3 extracciones con embudo de separación (para las extracciones liq – liq). Los solventes empleados para las separaciones sol – liq fueron éter de petróleo 20 – 40, acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (9:1), butanol y diclorometano/metanol (4:1). Por otra parte los solventes empleados para la separación liq – liq fueron éter de petróleo 20 – 40, acetato de etilo, diclorometano y butanol. El análisis de los resultados se realizó mediante placas cromatográficas.



ya que no se puede utilizar en la muestra 6 o 9 y en las otras que se intentara reducir la cantidad de metanol que en la separación se arrastren los Metanol que Acetona. El objetivo de la separación de los metabolitos.

Extracción de metabolitos de NATURALCOS.

El objetivo de la extracción de los metabolitos de NATURALCOS es obtener el extracto hidroalcohólico de los sólidos/líquidos del extracto liofilizado, con solventes de menor punto de ebullición Teórico, deberían extraerse los metabolitos de NATURALCOS.

El objetivo de la extracción de los metabolitos de NATURALCOS es obtener el extracto hidroalcohólico molido. Primeramente, se realizaron 3 extracciones sol – liq y tres extracciones liq – liq y tres extracciones con embudo de separación (para las extracciones liq – liq). Los solventes empleados para las separaciones sol – liq fueron éter de petróleo 20 – 40, acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (9:1), butanol y diclorometano/metanol (4:1). Por otra parte los solventes empleados para la separación liq – liq fueron éter de petróleo 20 – 40, acetato de etilo, diclorometano y butanol. El análisis de los resultados se realizó mediante placas cromatográficas.

Las placas cromatográficas son las siguientes:

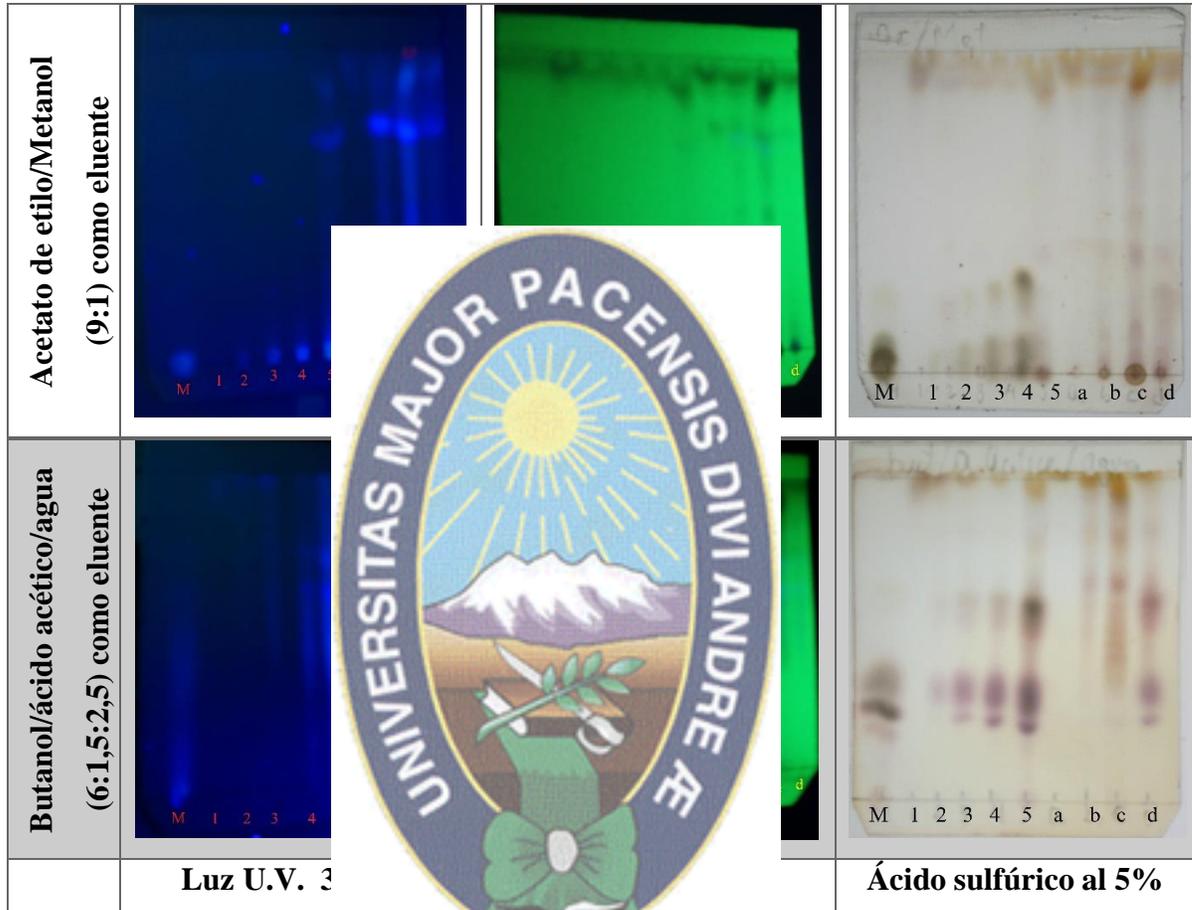


Figura 17. Placas cromatográficas obtenidas de la separación sólido – líquido en las que se usó como eluyente: acetato de etilo (1), acetato de etilo y diclorometano/metanol (4:1) (2), acetato de etilo (3) y acetato de etilo (5). También se tiene el extracto de petróleo 20 – 40 (6) con ácido sulfúrico al 5%, luz U.V. de 365 y 254 nm. “M” es el extracto hidroalcohólico de NATURALCOS sin ningún tratamiento.

obtenidos de la separación sólido – líquido que fueron éter de petróleo (c) y butanol (d). Revelado con ácido sulfúrico al 5%.

Las placas cromatográficas muestran que en la extracción sólido – líquido el solvente que extrajo en mayor cantidad metabolitos fue diclorometano/metanol 4:1, seguido de butanol, acetato de etilo/metanol (9:1) y por último acetato de etilo. Convendría realizar extracciones con butanol o con diclorometano/Metanol, pero por la poca cantidad de los solventes que se disponen, se optó como primera opción por la mezcla Acetato de

etilo/Metanol 9:1. Por otra parte, en las extracciones líquido – líquido se aprecia que el solvente que extrae mayor cantidad de metabolitos es el diclorometano, seguido por el butanol y el acetato de etilo. Los metabolitos extraídos en esta separación no son los mismos que los que se presentan en la extracción sólido – líquido. Los R_f de los metabolitos separados en la extracción liq – liq indica características más apolares. También se aprecia una menor abundancia en comparación con la extracción sol – liq.

En función a los resultados de las extracciones con acetato de etilo/metanol (9:1) y de las extracciones con diclorometano/butanol (1:1) que el mejor solvente para las extracciones de los metabolitos de los extractos de NATURALCOS son el acetato de etilo y el diclorometano/butanol, se realizaron nuevas extracciones, cambiando la cantidad de solvente.

Para determinar la cantidad de metabolitos en las extracciones por separado se realizaron las siguientes pruebas:

que se trabajara con acetato de etilo – líquido. Se tiene en cuenta que aparte se realizaron nuevas pruebas de búsqueda del uso de menor cantidad de solvente. Para determinar la cantidad de metabolitos en las extracciones por separado se analizaron las siguientes pruebas:



Figura 18. Placa cromatográfica TLC que retrata la extracción continua con acetato de etilo/metanol (9:1). Donde “M” es el extracto hidroalcohólico de NATURALCOS sin ningún tratamiento, “L1” es la primera extracción, “L2” es la segunda extracción, “L3” es la tercera extracción, “L4” es la cuarta extracción, “L5” es la quinta extracción, “L” es la unión de todas las extracciones y “M” es el extracto hidroalcohólico de NATURALCOS sin ningún tratamiento. Revelado con ácido sulfúrico al 5 %.

La placa cromatográfica muestra como disminuye la concentración de los metabolitos al realizar mayor cantidad extracciones. Si bien se puede seguir realizando más separaciones, se nota la posibilidad de extracción de otro tipo de metabolitos. Por lo tanto, se recomienda realizar 5 extracciones consecutivas.

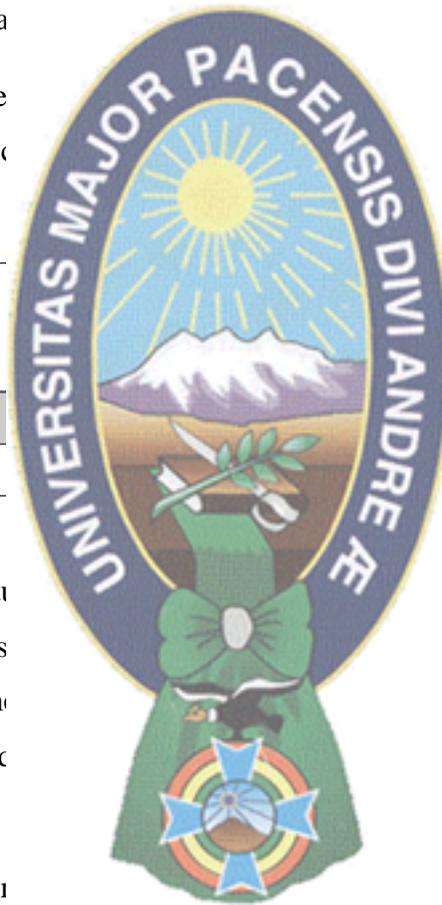
Una vez determinado el mejor solvente de separación y el número de extracciones necesarias para la separación a mayor escala:

Tabla 10. Masas de separación a mayor escala

N	Masa del extracto de maca [g]
33	100,2815
35	75,7140

El extracto 33 se obtuvo al realizar 5 extracciones de acetato de etilo/metano filtrados y concentrados. Similar tratamiento se dio al extracto 35 de 1:2, porque no se tenía

Analizando los resultados se aprecia que el extracto 35 presenta un mayor rendimiento que el extracto 33. Esto también se aprecia en la placa TLC realizada, en donde se nota una mayor cantidad de metabolitos extraídos con butanol. En función al resultado se opta por trabajar con el extracto 35 obtenido con butanol.



mayor escala:

JRALCOS empleado para la eliminación de la humedad, y masas de los extractos obtenidos.

Masa del extracto obtenido [g]	Rendimiento [%]
0,64	0,64
2,8368	3,75

anteriormente, que consiste en agitar por 15 minutos con la mezcla metano/solvente de 1:6, uniéndose los componentes. Como la relación soluto/solvente fue de 1:2, el solvente empleado fue butanol.



Figura 19. Placa cromatográfica desarrollada con acetato de etilo/metanol (9:1) y 35 obtenidos con ácido sulfúrico al 5%.

4.3.3. Separación por cromatografía líquida al vacío.

Para comenzar la separación de los compuestos de NATURALCOS, se emplearon 2,6932 g de extracto de plantas. Se empleó una columna de cromatografía empleando un solvente de

acetato de etilo y 35 obtenidos con acetato de etilo con ácido sulfúrico al 5%.

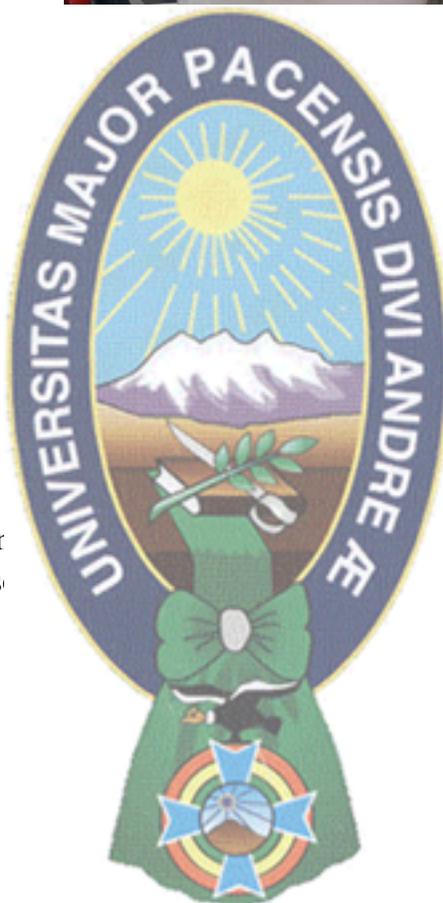
separación butanólica del extracto de plantas. Se realizó la cromatografía líquida al vacío. Se empleó una columna de cromatografía y se realizó la separación de los

Tabla 11. Solventes empleados para la separación de los compuestos mediante columna de cromatografía líquida al vacío.

Nº de fracción	Etanol [%]	Etanol [%]
1	0	0
2	95	5
3	90	10
4	80	20
5 – 26	70	25
27 – 30	0	100



Figura 20. Color de separación de las fases.



metanol), obtenido de la
de NATURALCOS.



Figura 21. Placas cromatográficas TLC de las fracciones obtenidas de la columna VLC del extracto 35. “M” es el extracto hidroalcohólico de NATURALCOS sin ningún tratamiento. Revelado con Ácido sulfúrico al 5%, luz U.V. 365 y 254 nm.

Por la figura 21, se nota que la fracción 27 tiene un compuesto aparentemente puro, por lo que se lo lleva a analizar por RMN. El espectro obtenido es el siguiente:

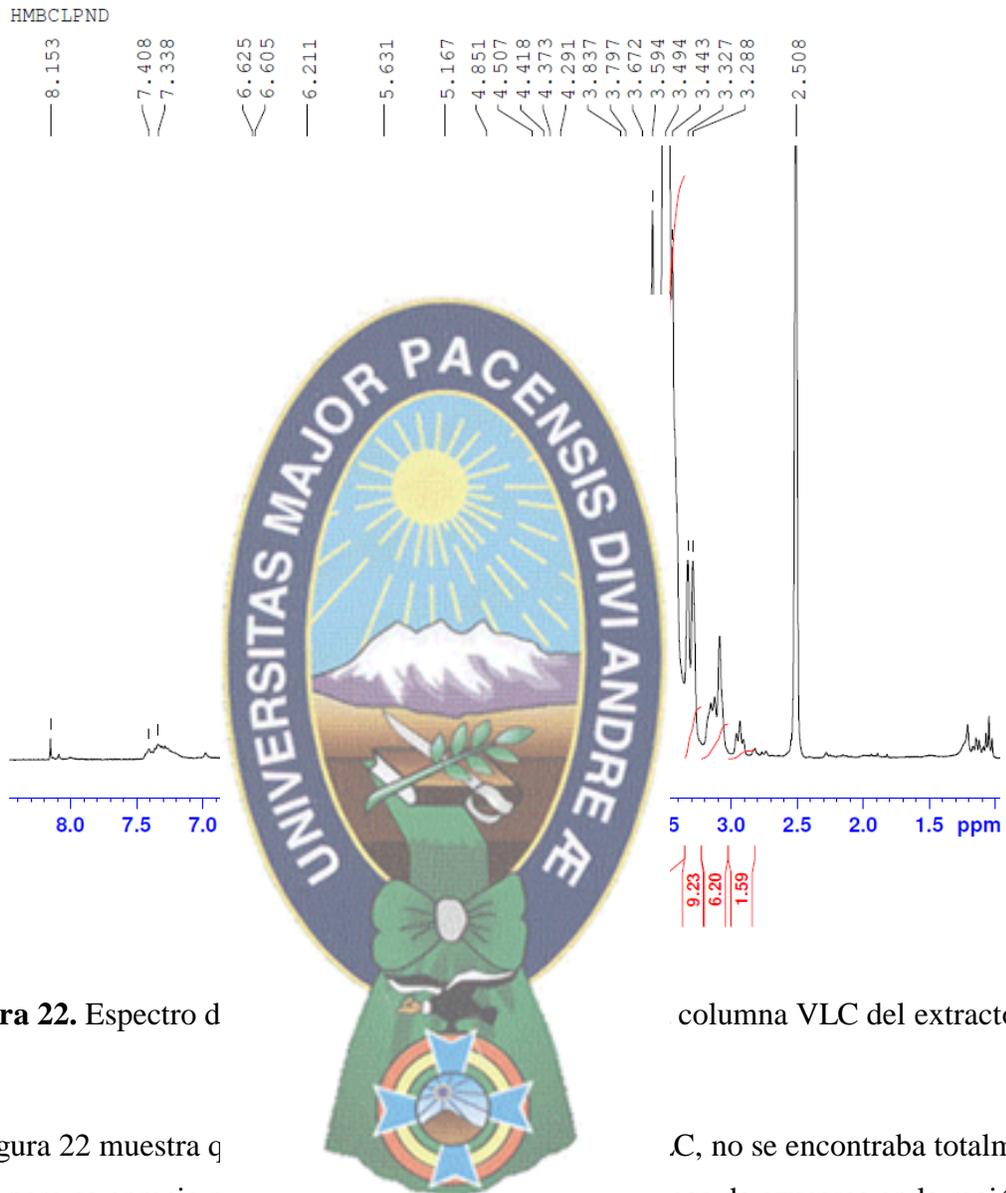


Figura 22. Espectro d

columna VLC del extracto 35.

La figura 22 muestra q
pura, pero se aprecia principalmente los picos característicos de azúcares en la región de 3 y 4 ppm.

.C, no se encontraba totalmente

En función a las placas cromatográficas anteriores, se realizaron las siguientes uniones de fracciones: del 1 al 5 (**1**), del 7 al 8 (**4**), del 9 al 13 (**5**), del 14 al 16 (**6**), del 17 al 24 (**7**), del 25 al 26 (**8**), 28 (**9**), 29 (**10**) y 30 (**11**). La fracción 6 se encontraba casi pura, salvo un poco de impureza que se encontraba en el frente de solvente. Por eso se realizó 3 lavados con éter de petróleo 20 – 40. La fracción que no posee la impureza se la denominó “6

(desengrasado)” (2) y la fase etérea separada se denominó “6 (fase orgánica)” (3). En la siguiente tabla se muestran las masas de las uniones de las fracciones y sus respectivos rendimientos:

Tabla 12. Masas de las uniones de las fracciones y sus respectivos rendimientos calculados en función al extracto usado en la cabeza de columna (extracto 39).

N		Rendimiento [%]
1		6,92
2	6 (0,45
3	6 (0,27
4		14,28
5		19,04
6		5,52
7		9,31
8		2,96
9		14,39
10		6,62
11		4,37

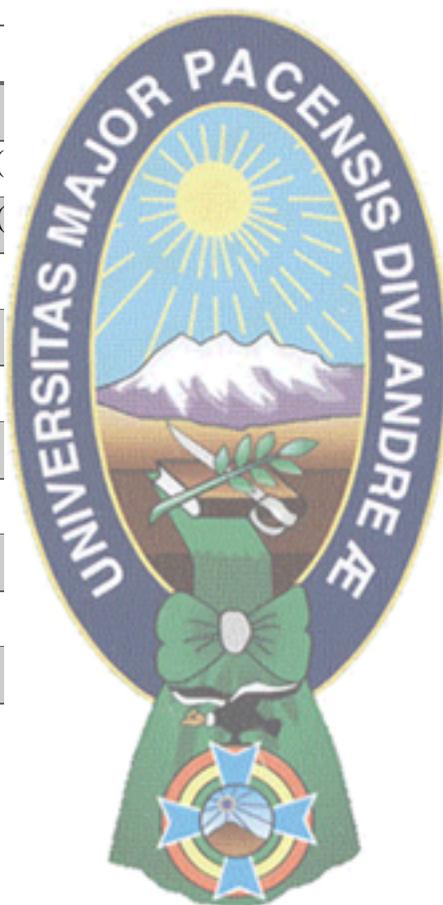




Figura 23. Placas cromatográficas de columna VLC con hidrato de alcohol.

Tres uniones de fracciones (19,04 %), “29” (14,3%) y “14 a la 16” serán utilizadas.

En la fracción 29, de estos fueron separados: se realizó 4 lavados con

los cristales a analizar por RMN. Los espectros obtenidos son los siguientes:

de las fracciones obtenidas de la extracción butanólica del extracto con ácido sulfúrico.

de rendimiento, la “9 a la 13” y la fracción 14, las uniones “9 a la 13” y “14 a la 16” serán utilizadas por columna sephadex LH-20.

Se observó la formación de cristales. Los cristales fueron lavados a un vial. Después se lavaron casi incoloros. Luego se llevó

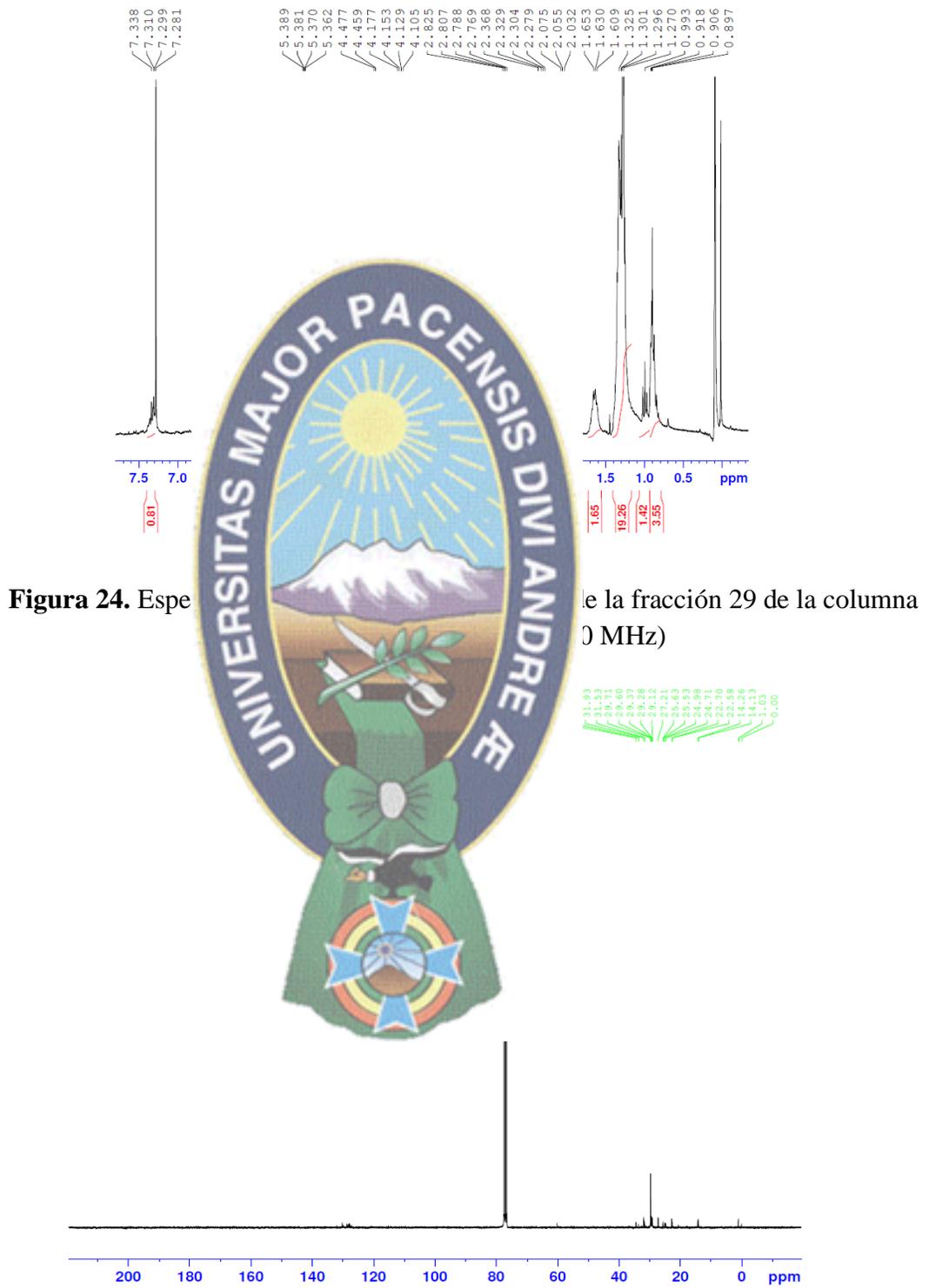


Figura 24. Espe

de la fracción 29 de la columna
(300 MHz)

Figura 25. Espectro de ^{13}C – RMN de los cristales de la fracción 29 de la columna VLC del extracto 35. (DMCO, 300 MHz)

Después de realizar los lavados etéreos de la fracción 6 se realizó la siguiente placa cromatográfica:



Figura 26. Placas cromatográficas de la fracción 6 (desengrasado) y 6b

6 denominado donde 6a es “6” y 6b es “6” en la columna VLC del extracto y 254 nm.

Los lavados con éter de petróleo son eficientes para la separación de las impurezas que se encuentran en la parte superior de la placa, pero la fracción que parecía estar pura, al momento de realizar nuevamente las placas se notaron dos R_f muy cercanos, que a su vez indican que sus polaridades son muy similares. Uno revelaba bajo la luz U.V. 365 nm (la de R_f mayor) en cambio el otro no presenta luminiscencia. La masa de la fracción de interés (6a) es de 12,2 mg. Por las observaciones realizadas, se determina que la separación de los compuestos será complicada, por lo que se dejará tal cual para posteriores estudios

4.3.4. Separación por columna Sephadex LH-20.

Una vez unidas las fracciones “9 a la 13” y “14 a la 16”, se tomó una alícuota de 0,5285 g de extracto que fue disuelto en 5 mL etanol de 96° y se lleva a estufa a 45 °C durante 15 minutos. Una vez disuelto, se enfrió a temperatura ambiente y se procede al sembrado en la columna sephadex LH-20 empleando etanol de 96° como eluyente. Se obtuvieron 50 fracciones:



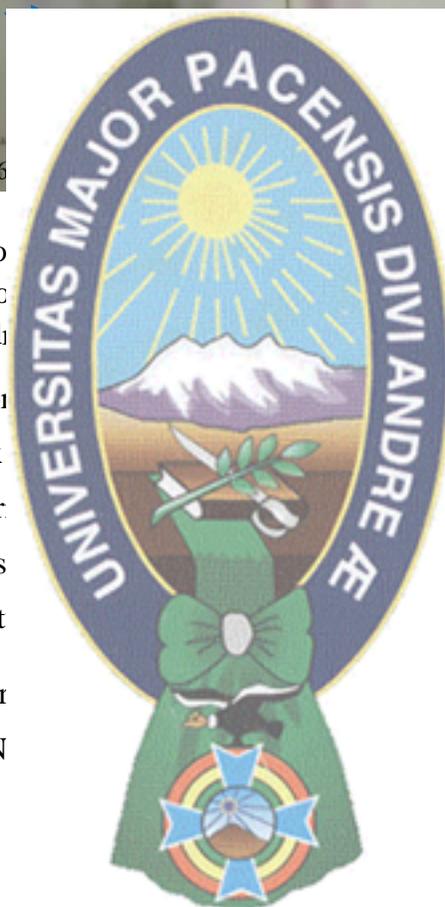
Figura 27. Columna sephadex LH – 20 realizada a la unión de las fracciones “9 a la 13” y “14 a la 16” obtenidas de la columna VLC del extracto 35.



Figura 28. Placas cromatográficas de las fracciones 9 a la 16. Revelado con ninhidrina. El extracto hidrolizado de la fracción 9 se analizó por RMN.

Los metabolitos mayoritarios son los de mayor peso molecular. La sephadex 200 permite afirmar que los mayoritarios son los de mayor peso molecular. Los dos primeros son similares por la similitud de sus patrones de spots.

En la fracción 9 se aplicó el método de análisis por RMN.



Las fracciones “9 a la 13” y “14 a la 16” corresponden al extracto butanólico del material de partida sin ningún tratamiento.

Las fracciones 17 y 30, marcando tres zonas muy grandes, corresponden al tamaño por lo que se puede afirmar que las fracciones, son los compuestos de mayor peso molecular que estructuralmente sean similares.

En la fracción 9 se aplicó el método de análisis por RMN que a pesar de tener impurezas, permitió identificar los siguientes:

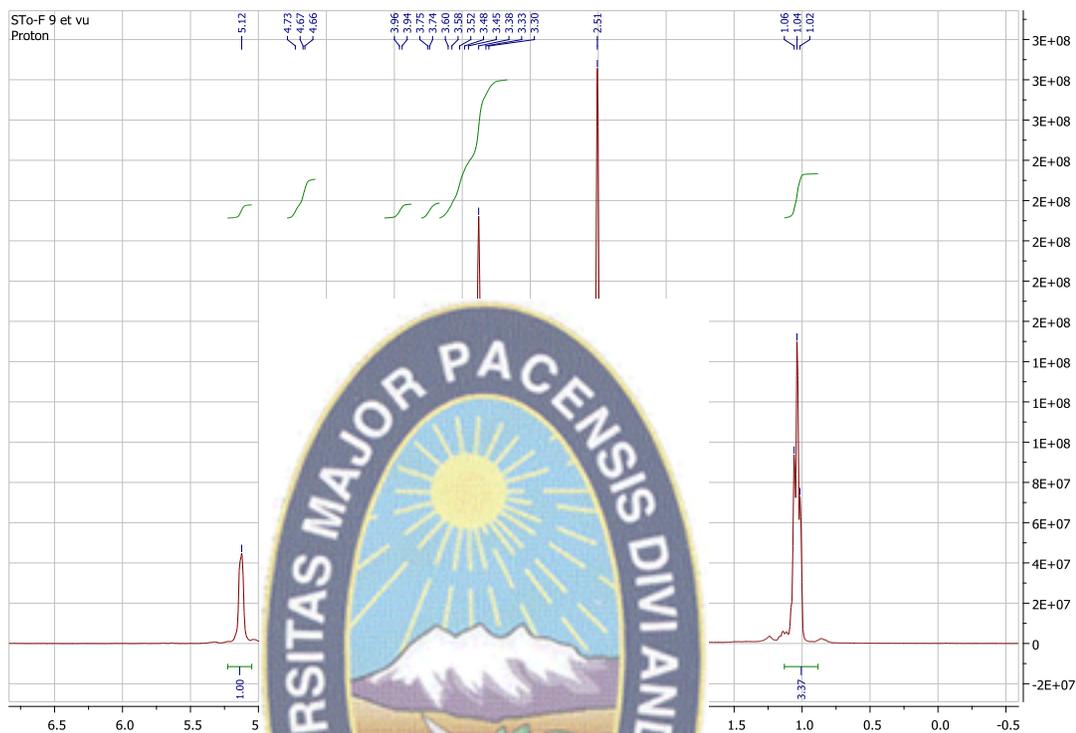


Figura 29. Espectro c

ración 29 de la columna VLC
(1H)



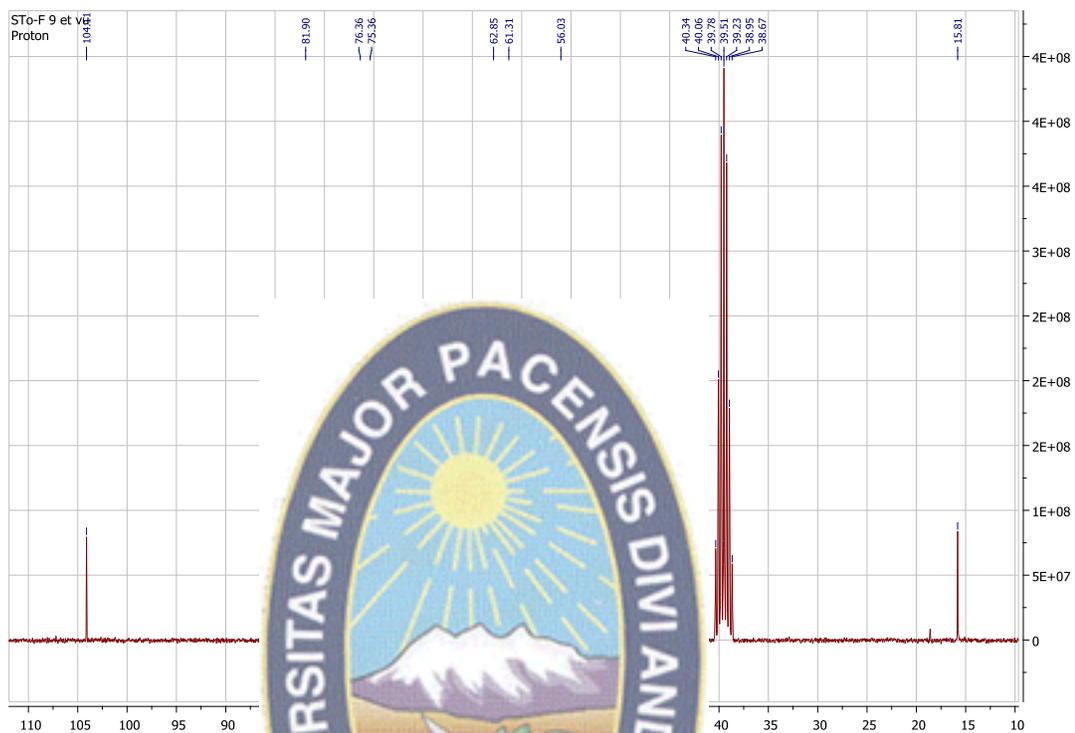


Figura 30. Espectro d

fracción 29 de la columna VLC (1Hz)

Se propone la siguiente

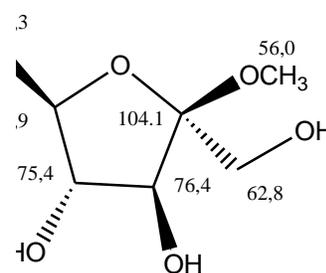
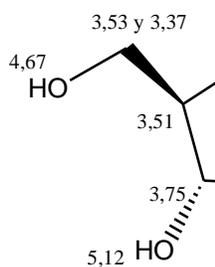
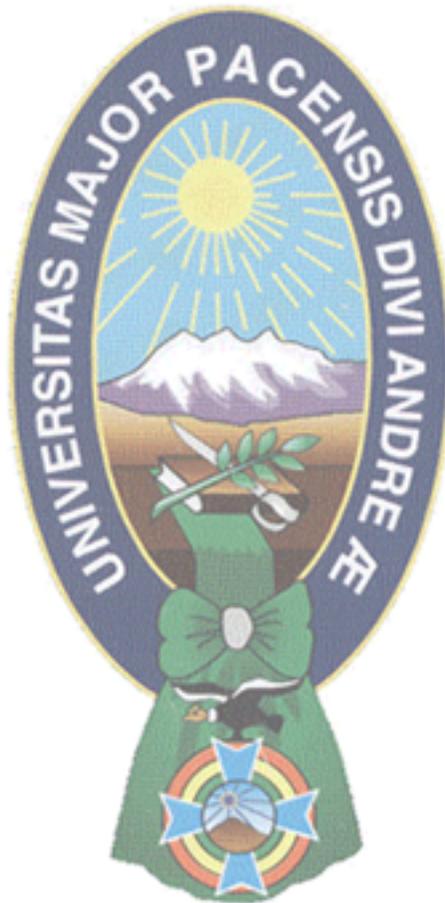


Figura 31. Estructura química propuesta para la fracción 9 de la columna sephadex

Este aislamiento concuerda con la bibliografía que reporta la presencia de fructosa en la harina de maca.^{26 27 28 29 30}

Como se ve en las placas de las columnas realizadas, se pueden separar otros compuestos mediante procesos posteriores, por lo que este trabajo muestra solo un inicio de la obtención de compuestos del extracto hidroalcohólico de la empresa NATURALCOS.



²⁶ Shimabuku Vega Naomi Fabiola, “COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Lepidium meyenii* Walp. (maca): COMPARANDO PROCEDENCIAS Y COLORES DEL ÓRGANO DE RESERVA”

²⁷ Coral Díaz Erika Alejandra, “IMPLEMENTACIÓN DE LA MACA ANDINA PERUANA EN LA ALIMENTACIÓN DIARIA DE MUJERES QUE REALIZAN ACTIVIDAD FÍSICA Y MENTAL”

²⁸ RAMOS ALFREDO SABINO, “DETERMINACIÓN DE FIERRO Y COBRE EN ALIMENTOS: MACA (*Lepidiumperuvianum*), MUÑA (*MinthostachyMollis*) Y CAÑIHUA (*Chenopodiumpallidicaule*) POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA A LA LLAMA”

²⁹ Castañeda, B, Castro de la Mata, R, Manrique, Ibañez L, Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers, “MACA” y *Lupinus mutabilis* Sweet, “CHOCHO” en ratas

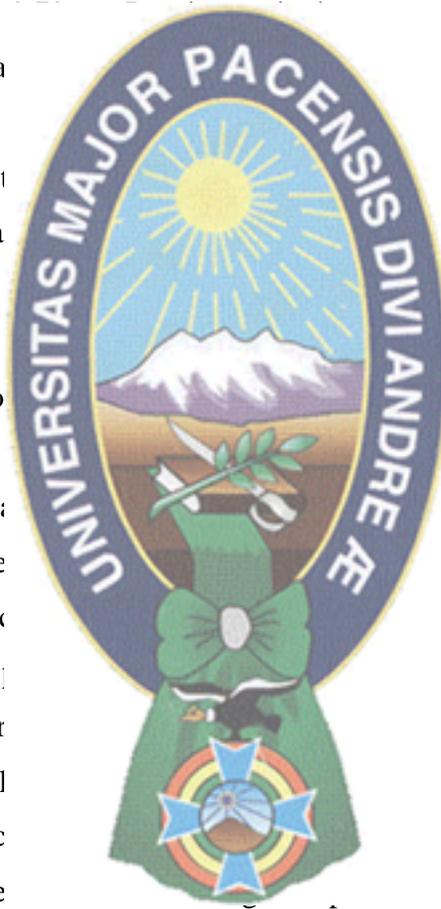
³⁰ Alvarado Alvarado Jesenia Ludy, “LA MACA ROJA (LEPIDIUM MEYENII) Y SU ACCION EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA”

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES.

- ✓ La muestra hidroalcohólica de NATURALCOS presentó un rendimiento de extracción del 34,35 ± 3,92 % en el estudio fitoquímico preliminar, una intensidad moderada para alcaloides, fenólicos y terpenos, y muy intensa para lactonas/cumarinas. Las pruebas para quinonas, saponinas y azúcares (con Cloruro férrico), fueron negativas.
- ✓ Al contrastar los resultados de las pruebas realizadas a lo largo del estudio se determina que la mezcla de etanol/agua 75:25. Porque esta concentración dio mejores resultados que dio mejores resultados para los alcaloides, y reporta una mayor intensidad para lactonas/cumarinas.
- ✓ Con relación al tiempo de maceración se apreció mucha diferencia. Salvo que con la mezcla de etanol/agua 75:25 macerados de 3 días con los de 10 días la prueba (saponinas).



En búsqueda de un tiempo de maceración que reporte resultados similares al extracto hidroalcohólico de NATURALCOS, se recomienda el macerado de 3 días, pero no hay mucha diferencia con el de 10 días, e inclusive con el extracto de NATURALCOS que tiene meses de maceración. Las únicas dos diferencias que se encontraron, fueron que en el extracto de NATURALCOS se notó una mayor intensidad para alcaloides y lactonas/cumarinas. Lo importante es que se observó

que en los meses de extracción, los compuestos separados no se degradan y aparentemente tampoco se generan artefactos.

- ✓ El estudio fitoquímico que se realizó para la extracción de metabolitos de interés farmacológico del extracto de NATURALCOS, determinó que se deben realizar 5 extracciones consecutivas, empleando como solvente butanol, con ultrasonido por 15 minutos. Manteniendo una relación soluto/solvente 1:2. Aplicando el método de extracción a 2,8369 g de extracto se obtuvo un rendimiento de 3,75 %. En la primera extracción se obtuvieron 2 fracciones que en placas de TLC no se movieron, definido, sin embargo, un análisis por resonancia magnética nuclear evidenció un espectro de resonancia que dio un indicio de los compuestos de la fracción 6, que son azúcares cercanos, que impidieron su separación. La escasa cantidad de compuestos dificultó su separación. En una posterior extracción se obtuvieron a la 13” y “14 a la 15” de la fracción 6, que concuerda con la bibliografía que reporta la presencia de fructosa en la harina de maca



de la empresa, se obtuvieron un rendimiento de extracción del 33 al 39 % de la fracción butanólica, se obtuvieron 5 fracciones. La primera fue la fracción 27, que se movió en la mancha con un R_f mediano pero no se movió en un análisis por resonancia magnética nuclear. La segunda fue la fracción 28, que se movió en la mancha con un R_f muy bajo. La tercera fue la fracción 29, que se movió en la mancha con un R_f muy alto. La cuarta fue la fracción 30, que se movió en la mancha con un R_f muy alto. La quinta fue la fracción 31, que se movió en la mancha con un R_f muy alto. Dando un rendimiento de extracción del 33 al 39 % mencionado. El segundo fue la fracción 27, que mostró dos compuestos con R_f muy similares, que tenían polaridades muy similares. La tercera fue la fracción 28, que tenía polaridades similares dificultaron su separación. En una posterior extracción se obtuvieron de la unión de las fracciones “9” y “10” se pudo aislar y elucidar un compuesto metilado de la fructosa, lo cual concuerda con la bibliografía que reporta la presencia de fructosa en la harina de maca

- ✓ El método propuesto recomienda emplear como solvente etanol/agua 75:25 por un tiempo de maceración de 3 a 10 días. Reportando un rendimiento del 33 al 39 %, que son alrededor de cuatro veces más que el de la empresa.

5.2. RECOMENDACIONES.

- ✓ El estudio realizado, es el primer paso para análisis más profundos de las muestras de Maca de la empresa de NATURALCOS, ya sea de la muestra hidroalcohólica o bien de la harina de maca. Dichos estudios podrían emplear solventes más apolares que extraigan otro tipo de metabolitos con una mayor selectividad para fitoesteroles, n... apolar, que pue...
- ✓ Si bien los res... notorias entre l... para la identific... de artefactos f... realizar estudio...
- ✓ Se demostró qu... de interacción c... a la separación... preliminar para... necesario reali...
- ✓ Es conveniente... como ser la... desarrollado, p... se encuentran... comercializado uene una concentración de 2:1 o 3:1, etcétera, que indicaría que el producto tiene el doble o el triple de compuestos de lo habitual.



CAPÍTULO 6

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Balick MJ, Lee R. Maca, “traditional food crop to energy and libido stimulant. *Altern Ther Health Med*”. 2002.
- Lock Oiga, Rojas Rosario. “Química y Farmacología de *Lepidium meyenii* Walp (“Maca)”
- Romero Violeta, “Efectos energéticos de la *Lepidium meyenii* Walpers)”
- <https://www.monocultivos.com/2012/05/01/propiedades-de-la-maca/>
- <http://www.quierocrecer.com/2012/05/01/propiedades-de-la-maca/>
- Zheng BL, He K, “Effect of Maca extract from *Lepidium meyenii* Walp. on sexual behaviour in male mice”, *J Ethnopharmacol* 2000; 72:115-120.
- Cicero AFG, Barja J, “Maca improves rat sexual behaviour in male rats”, *J Ethnopharmacol* 2000; 72:115-120.
- Cicero AFG, Piacentini G, “Maca improves rat sexual behaviour in male rats”, *J Ethnopharmacol* 2000; 72:115-120.
- Cicero AFG, Piacentini G, “Maca improves rat sexual behaviour in male rats”, *J Ethnopharmacol* 2000; 72:115-120.
- Gonzales GF, Cordova A, “Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats”, *Asian J Androl* 2001; 3:231-233.
- Gonzales GF, Cordova A, Gonzales C, Cheng A, Vega K, Villena A. “*Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men”. *Asian J Androl*. 2001; 3:301-303.
- Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A, Góñez C, Castillo S. “Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats”. *Asian J Androl*. 2001; 3:231-233.



Dávalos Juan Z., “Propiedades de *Lepidium meyenii* Walp. Chacón o *Lepidium meyenii* Walpers)”

[maca.shtml](http://www.maca.shtml)

g ZY, et al. “Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* Walp. mice and rats”, 2000.

Lepidium meyenii Walp. improves sexual behaviour in male mice on spontaneous locomotor activity”, *J Ethnopharmacol* 2000; 72:115-120.

Pizza C. “Hexanic Maca extract improves rat sexual behaviour in methanolic and chloroformic extracts”, *J Ethnopharmacol* 2000; 72:115-120.

A, Góñez C, Castillo S. “Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats”. *Asian J Androl* 2001; 3:231-233. absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men”. *Andrologia* 2002 34:367-72.

- Ramos Alfredo Sabino, “Determinación de fierro y cobre en alimentos: maca (*Lepidium peruvianum*), muña (*Mintostachy mollis*) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) por espectroscopía de absorción atómica a la llama”.
- Castañeda, B, Castro De La Mata, R, Manrique, Ibañez L, “Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers, “maca” y *Lupinus mutabilis* Sweet, “chocho” en ratas
- Alvarado Alvarado, Francisca Lidia, “La maca peruana (*Lepidium meyenii*) y su acción en el tratamiento de l

