

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



**BIOENSAYO PARA DETERMINAR EL EFECTO DE CUATRO
CATEGORIAS DE MACA AMARILLA (*Lepidium meyenii*)
PROVENIENTES DE LA LOCALIDAD DE HUALLANCA (ANCASH)
SOBRE EL RECuento DE ESPERMATOZOIDES EN TESTÍCULO,
EPIDÍDIMO Y CONDUCTO DEFERENTE EN ANIMALES
EXPERIMENTALES**

Autora: Stefanny Lizet Sanchez Salazar

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Lima- Perú

2017

ASESOR

Dr. Gustavo Gonzales Rengifo

Jefe del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, e Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia

DEDICATORIA

La elaboración de la presente tesis no sólo es producto del esfuerzo individual sino también del colectivo.

Agradezco a Dios por guiar mis pasos colocando siempre a las personas correctas en mi vida.

A mis padres por apostar todo por mí, por su sacrificio, su amor, por esos consejos que guardo en el corazón, porque mis sueños también son sus sueños ¡El título ya es nuestro!

A mi familia y a los integrantes del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción por su soporte.

A mi maestro el Dr. Gustavo Gonzales por confiar en mí y ayudarme a ver más allá con sus enseñanzas.

A Jorge, por su compañía, por ser mi mano derecha en esos largos días.

A Nick, por la fortaleza y motivación que me diste durante este proceso, mi corazón está contigo.

Gracias a todos ustedes por creer en mí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ubicación Taxonómica de la Maca	
1.2. Categorías de Maca	
1.3. Huallanca	
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	07
2.1. Planteamiento del problema y justificación	
2.2. Pregunta de investigación	
2.3. Hipótesis	
III. OBJETIVOS	10
1.1. Objetivos generales	
1.2. Objetivos específicos	
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Animales experimentales	
4.2. Maca	
4.3. Preparación de los extractos acuoso	
4.4. Definición de los Grupos de Estudio	
4.4.1. Bioensayo 1 con pH acidificado (pH=4)	
4.4.2. Bioensayo 2 con el pH natural (pH≈6)	
4.4.3. Bioensayo 3 con el pH alcalinizado (pH=8)	

- 4.5. Sacrificio de los animales en estudio
- 4.6. Administración de los extractos acuosos
- 4.7. Evaluación del pH, Glucosa, polifenoles y DPPH
- 4.8. Conteo de Espermatozoides
 - 4.8.1. Conteo de espermatozoides en Conducto Deferente
 - 4.8.2. Conteo de espermatozoides en Testículo
 - 4.8.3. Conteo de espermatozoides en Epidídimo
- 4.9. Análisis estadístico

V. RESULTADOS	19
5.1. pH, glucosa, polifenoles y DDPH de los extractos acuosos	
5.2. Efecto sobre el peso corporal y de órganos	
5.3. Efecto de la maca sobre el conteo espermático en el Bioensayo 1 (pH=4)	
5.4. Efecto de la maca sobre el conteo de espermatozoides en el Bioensayo 2 (pH≈6)	
5.5. Efecto de la maca sobre el conteo de espermatozoides en el Bioensayo 3 (pH=8)	
5.6. Efecto del pH en Sperm Count	
5.7. Efecto de las vías de administración	
VI. DISCUSIÓN	30
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. REFERENCIAS	37

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El consumo de hipocótilos de *Lepidium meyenii* (Maca), una planta nativa de los Andes centrales del Perú, tiene importantes efectos en la fertilidad. El motivo del presente trabajo es evaluar el efecto de las diferentes categorías (catalogadas así desde la primera calidad hasta la cuarta calidad de acuerdo al tamaño de los hipocótilos); el efecto de diferentes pH (ácido, natural y alcalino) y el efecto de las vías de administración (orogástrica vs intraperitoneal). Como respuesta biológica se evaluará el recuento espermático en ratones de la cepa Swiss.

MÉTODOS: Se utilizaron cuatro tamaños diferentes de maca amarilla provenientes del distrito de Huallanca, Departamento de Ancash, ubicado a 4250 msnm. Se realizaron tres bioensayos considerando el pH acidificado con ácido clorhídrico (pH=4), el pH normal, y alcalinizado con hidróxido de sodio (pH=8). Para cada bioensayo se utilizaron 35 ratones, los cuales fueron administrados con agua destilada (control), un extracto atomizado estandarizado de maca negra (control positivo) y extractos acuosos de las cuatro categorías con una cantidad de 5mg de maca durante 3 días en un volumen de 0.5mL por animal y también se evaluó el efecto de dos vías de administración (orogástrica e intraperitoneal). Después del tratamiento los ratones fueron sacrificados evaluándose la producción diaria de espermatozoides en testículo, y el conteo espermático en epidídimo y conducto deferente. Se consideró un $P < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS: La primera y segunda categoría, ambas tuvieron los valores más ácidos de pH y la mejor actividad biológica. Los extractos acuosos de maca de primera y segunda categoría con el pH acidificado presentaron un efecto significativo sobre el conteo de espermatozoides en todos los órganos estudiados, seguido del extracto acuoso de pH natural, mientras el extracto acuoso alcalinizado no presentó efecto ($P > 0.05$). La vía de tratamiento más efectiva fue la orogástrica, obteniéndose un elevado recuento espermático ($P < 0.05$) a diferencia de la vía intraperitoneal ($P > 0.05$).

CONCLUSIÓN: El extracto acuoso de maca amarilla acidificado de primera categoría mostró el mejor efecto sobre el recuento de espermatozoides en los diferentes órganos reproductivos y la mejor vía de administración fue la orogástrica, lo que sugiere que el pasaje gastro-intestinal promueve la producción de principios activos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Consumption of *Lepidium meyenii* hypocotyls (Maca), a native plant of the Central Andes of Peru, has important effects on male fertility. For the first time the biological value of Maca cultivated in the Northern Peruvian Andes is published. The objective of this study is to evaluate the effect of different categories (cataloged as well from the first quality to the fourth one according to the size of hypocotyls); the effect of different pH (acid, natural and alkali) and the effect of routes of administration (orogastric vs intraperitoneal). As a biological response, sperm count was evaluated in Swiss strain mice.

METHODS: Four different sizes of Yellow Maca were used from Huallanca - Ancash Department, located at 4250 msnsm. Three bioassays were performed considering normal pH, pH acidified with hydrochloric acid (pH=4) and pH alkalized with sodium hydroxide (pH=8). For each bioassay, 35 mice were used, which were administered with distilled water (control), an standardized atomized extract of Black Maca (positive control) and aqueous extracts of four categories with 5mg of maca during 3 days with a volume of 0.5 mL per animal and the effect of two routes of administration (orogastric and intraperitoneal) was also evaluated. After treatment mice were sacrificed evaluated daily sperm production in testis, and sperm count in epididymis and deferens vas. $P < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS: First and Second category had the most acidic pH and better biological activity. Aqueous extracts of first and second category of maca with acid pH had a significant effect

on sperm count in all reproductive organs, followed by the aqueous extract with natural pH, while the alkali aqueous extract did not show a significant effect ($P>0.05$). The most effective treatment route was orogastric, yielding a high sperm count ($P<0.05$) in contrast to intraperitoneal ($P>0.05$).

CONCLUSION: Aqueous extract of first category of maca with acid pH showed the best effect on sperm count on reproductive organs and the best route of administration was orogastric, suggesting that the gastro-intestinal passage promotes the production of active principles.

Key words: *Lepidium meyenii*, categories of yellow maca, sperm count, pH, routes of administration

I. INTRODUCCIÓN

Lepidium meyenii (Maca) es una planta de la familia *Brassicaceae* que crece entre los 4000 y 4500 msnm en los Andes centrales del Perú. Existen variedades de maca de acuerdo al tamaño (o categoría) y al color del hipocótilo como el amarillo, rojo, negro, etc (Valerio & Gonzales, 2005), cada una con diferentes propiedades biológicas que se deben a la variedad de sus componentes o al suelo ácido en el que crecen. Con el mayor interés y el auge por la demanda de maca se ha empezado a comercializar los hipocótilos según su tamaño siendo calificados como de primera, segunda, tercera y cuarta. (**Fig. N°1**) No se sabe si la actividad biológica es similar para cada uno de los tamaños de maca.

Entre estos componentes se encuentran los glucosinolatos, los cuales se encuentran inicialmente en una forma inactiva (Rouzaud et al., 2003) y a su paso por el tracto digestivo se activa, es uno de sus metabolitos secundarios más representativos y abundantes (Jhons, 1981) tales como el glucosinolato aromático, bencilglucosinolato (Dini et al., 1994) y el p-metoxibencil isotiocianato (Li et al., 2001); ácidos grasos poli insaturados como los macaenos y macamidias (Zheng et al., 2000); esteroles como β -sitosterol, campesterol y estigmasterol; alcaloides como clorhidrato de 1,3-dibencil-4,5-dimetilimidazol y clorhidrato de 1,3-dibencil-2,4,5-trimetilimidazol (Cui et al., 2003); flavonoides como el flavonol y la quercetina muchos de ellos con actividad antioxidante (Lee et al., 2004); y carbolinas como el ácido (1R, 3S)-1-metil-tetrahidro- β -carbolina-3-carboxílico, derivado benzoilo del ácido maleico (Piacente et al., 2002). También presenta compuestos polifenólicos, metabolitos secundarios que se encuentran en muchos frutos y plantas y en la actualidad son de gran interés nutricional ya que son potenciales antioxidantes; en el caso de la maca estudios previos han sugerido que el efecto biológico de la maca podría deberse a la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales (Lee et al., 2005; Catillo & Lock, 2005) protegiendo

al organismo del daño oxidativo producidos por los radicales libres, por lo tanto son los metabolitos secundarios los que podrían conferirle a la maca los beneficios terapéuticos. En cuanto a la composición de metabolitos primarios, los hipocótilos secos molidos están compuestos aproximadamente por 54.6-60% de carbohidratos (1,55% de glucosa), 8.87-11.6% de proteínas, 1.09-2.2% de lípidos, 8.23-9.08 de fibra% y 4.9-5% de cenizas (Castaño-Corredor, 2008). La glucosa es un glúcido relacionado con la cantidad de carbohidratos que exista en un alimento, el organismo absorbe los monosacáridos transformándolo en energía para realizar diferentes funciones. Los compuestos polifenólicos, la actividad antioxidante y la glucosa no han sido comparados entre las diversas variedades de tamaño del hipocótilo.

La mayoría de los estudios realizados con *Lepidium meyenii* demuestran un efecto promotor de la fertilidad tanto masculina como femenina, se sabe también que mejora la función sexual, la memoria, la inmunidad, brinda energía y vitalidad, revierte la hiperplasia benigna de próstata y la osteoporosis, posee capacidad antioxidante, anti-inflamatoria, entre otros (Gonzales, 2006). Con respecto a su actividad biológica sobre la reproducción masculina, Un estudio con solo tres días de tratamiento con maca oral mejoró significativamente un aumento en el recuento espermático (Gonzales *et al.*, 2006). A su vez el tratamiento de 14 días con extracto acuoso de maca aumenta el peso de los testículos y epidídimos relacionado a un aumento en el número de espermatozoides en estos órganos, a su vez se incrementó la frecuencia relativa de los estadios IX-XII donde ocurre la mitosis en el proceso de espermatogénesis de la rata (Gonzales *et al.*, 2001). El tratamiento con tres variedades de maca por 7 días mejoró los estadios de espermiación y mitosis en el mismo modelo animal, siendo la maca amarilla una de las que mejores resultados tuvo (Chung *et al.*, 2005). Ensayos en humanos sanos tratados con maca gelatinizada durante 4 meses, mostraron una mejora significativa en su producción espermática, elevando el conteo total de espermatozoides y mejorando la motilidad espermática comparado con el control (Gonzales *et al.*, 2001). Así mismo se ha reportado que la administración de extracto acuoso de maca revierte

los efectos nocivos del plomo sobre la espermatogénesis (Rubio *et al.*, 2006) y de la altura (Gonzales *et al.*, 2004)

El presente proyecto de investigación tiene por finalidad evaluar el efecto de cuatro categorías de *Lepidium meyenii* (Maca Amarilla) sobre el conteo espermático en ratones adultos. Por otro lado se sabe que la maca se desarrolla en un ambiente ácido, por ello, en parte del experimento se modifica el pH natural de la maca de tal manera de poder estudiar la respuesta biológica en el pH natural (ácido) o luego de ser más acidificado o luego de ser alcalinizado.

1.1. Ubicación Taxonómica de la Maca

La clasificación taxonómica fue basada según el Sistema de Clasificación Filogenético de Adolph Engler publicado en la XII edición del Syllabus Der Pflanzenfamilien del año 1954-1964 (Mostacero *et al.*, 1993), tal y como sigue:

DIVISIÓN: Angiospermae

CLASE: Dicotyledoneae

SUBCLASE: Archichlamydeae

ORDEN: Papaverales

FAMILIA: Brassicaceae

GENERO: *Lepidium*

ESPECIE: *Lepidium meyenii*

NOMBRE VERNACULAR: “Maca”, “maca maca”, “Ayak willku”

1.2. Categorías de Maca

La maca se cosecha entre los meses de Mayo y Julio (estación de invierno) cuando los hipocótilos alcanzan un máximo tamaño (León, 1964; Tello et al., 1992). Aquí se observa que el cultivo produjo diferentes “categorías de maca” caracterizado por el tamaño del hipocótilo (**Fig. N°1**), siendo la primera categoría la que presenta los hipocótilos más grandes mientras la cuarta categoría presenta los hipocótilos más pequeños cuyos pesos y diámetros promedio que les brindan dicha característica se detallan en la **Tabla N°1**. Es necesario el estudio de los efectos de las diferentes categorías de maca dado que es uno de los productos bandera del país, de gran exportación (SIICEX, 2015).

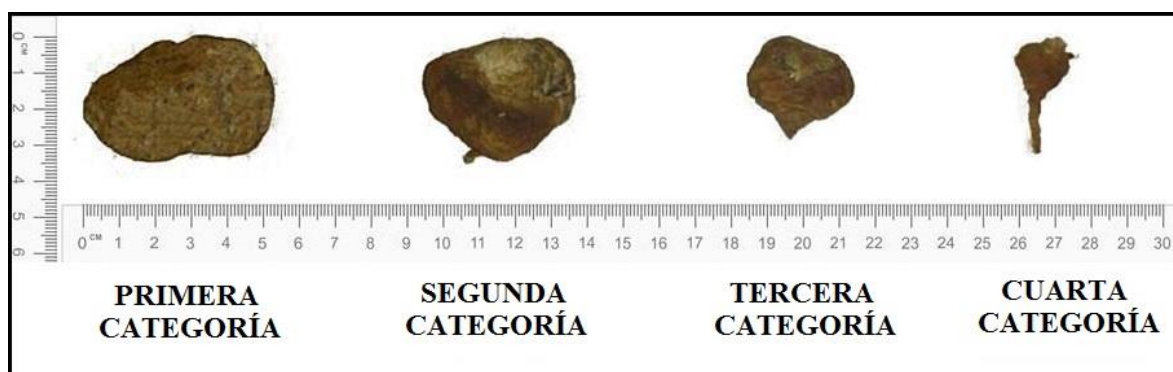


Fig. N°1: Diferentes categorías de Maca Amarilla de Huallanca

Categorías	Peso ($\bar{X}\pm S$)	Diámetros ($\bar{X}\pm S$)	
		Ancho	Largo
Primera	20.2±3.7	4.0±0.3	3.4±0.5
Segunda	12.7±1.9	3.0±0.2	2.8±0.2
Tercera	6.3±1.4	2.3±0.2	2.0±0.3
Cuarta	1.7±1.3	1.0±0.3	1.1±0.3

Tabla N°1: Pesos y diámetros de las cuatro categorías de maca amarilla de Huallanca.

X: Promedio; S: Desviación Estándar

1.3. Huallanca

Huallanca es un distrito ubicado en la zona Sureste de la Región Ancash (**Fig. N°2**). Geográficamente se encuentra en el lado Este de la cadena Occidental de la Cordillera de los Andes del Perú. El distrito de Huallanca abarca una extensión de 873.39 km², que corresponde aproximadamente al 30% del total de la superficie de la Bolognesi. Se encuentra a 4200msnm y su temperatura anual es de 9.2°C.

En los últimos años, por buscar nuevas tierras de sembrío, se ha empezado a cultivar maca en dicho lugar por tener similares características a los departamentos de origen como Cerro de Pasco y Junín. Las diferencias de altitud, temperatura y suelos de los departamentos de Áncash, Cerro de Pasco y Junín se encuentran detallados en la Tabla N°2.



Fig. N°2: Mapa del Distrito de Huallanca y la zona de sembríos de Maca.

Departamento	Altitud (msnm)	Temperatura anual (°C)	pH del suelo
Cerro de P. (Ninacaca)	4140	6.1 °C	4.41-5.35
Junín (Carhuamayo)	4126	6°C	4.19-5
Áncash (Huallanca)	4200	9.2°C	4.19-5.16

Tabla N°2: Comparación de altitud, temperatura anual y suelos de Cerro de Pasco (Ninacaca), Junín (Carhuamayo) y Áncash (Huallanca).

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema y justificación

En las últimas décadas se ha estudiado el efecto de las variedades de *Lepidium meyenii* demostrando distintas propiedades biológicas (Gonzales *et al.*, 2005) debido a las diferencias en el suelo de cultivo, a su composición y cantidad de metabolitos en el producto entero. Actualmente hay un interés en el tamaño del hipocótilo por la creencia de que mayores tamaños pueden tener mayores propiedades funcionales, por lo que comercial y nutricionalmente se opta por el cultivo de hipocótilos de mayor tamaño o de primera categoría. Un estudio en Arequipa evalúa los diferentes tamaños de *Caesalpinia spinosa* (tara) demostrando la importancia de las fitohormonas en el crecimiento de hipocótilos de tara (Bustamante *et al.*, 2012). Sin embargo, no existen estudios que demuestren si el efecto biológico varía con respecto al tamaño de la maca,

Investigaciones científicas hechas sobre la maca y sus efectos han permitido que el volumen de sus exportaciones aumente exponencialmente en los últimos años (SIICEX, 2015) y dado este apogeo se hace imprescindible investigar si existen diferencias sustanciales de actividad biológica entre categorías de maca ya que las normas comerciales se han impuesto sin ningún sustento científico. Además, este estudio ayudará a validar la importancia de la utilización de las plantas más representativas del país y utilizada por gran cantidad de pobladores.

Como se ha mencionado, la maca amarilla modula el conteo de espermatozoides, aumentando su número (Gasco *et al.*, 2007), es por ello que se propuso realizar el siguiente proyecto de investigación evaluando si los tratamientos con extractos acuosos de cuatro tamaños o categorías de maca amarilla afectan la respuesta biológica. La respuesta

biológica está basada en un modelo de bioensayo de tres días de duración que ya ha sido validada y probada extensivamente (Gonzales *et al.*, 2006) donde ante un estímulo con extractos de diferentes tipos de maca se observa al tercer día de tratamiento un aumento en el conteo de espermátides en testículo, y de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente. Cabe recalcar que no se encuentran ni se pretenden evaluar diferencias significativas en cuanto al peso de los órganos reproductivos y corporales debido al corto tiempo del tratamiento.

Otros estudios científicos sobre el cultivo de maca muestra que crece adecuadamente en los Andes Centrales debido a que esta zona es privilegiada por tener temperaturas que no llegan a ser muy altas ni muy bajas y ello permite el crecimiento óptimo de la maca (Janampa *et al.*, 2016). Estas temperaturas se obtienen gracias a la cercanía al Ecuador. Por ello en momentos donde se destaca un rol negativo del cambio climático de los cultivos en el mundo, el Perú no escapa de esta realidad. Por ello en los últimos años se ha tratado de buscar nuevos suelos, más bien, un poco más hacia el norte de los Andes centrales tratando de realizar los cultivos en zonas donde las temperaturas puedan ser óptimas para el crecimiento de la maca. En ese sentido la presente investigación evalúa la maca obtenida en una zona ubicada en Ancash denominada Huallanca ubicada a 4200 metros sobre el nivel del mar, las muestras fueron proporcionadas por la empresa MG Natura Perú SAC.

Otro de los parámetros evaluados fue el efecto del pH sobre la respuesta biológica en la maca. Se sabe por lo descrito por Gonzales en el 2006 que pueden haber hipocótilos con diferentes pH, sin embargo no se conoce si el pH del extracto acuoso de maca amarilla afecta la respuesta biológica en Sperm Count. Estudios previos han mostrado que a menor pH de la muestra de maca mayor es la actividad biológica (Gonzales, 2006). Para comprobar dichos resultados se realizó un ensayo acidificando y alcalinizando los extractos para comparar el efecto biológico de todos los tratamientos.

Con respecto a la vía de administración del tratamiento, las vías más más utilizadas son la vía orogástrica y la intraperitoneal. La mayoría de estudios utiliza la vía orogástrica por su aceptabilidad, seguridad y eficacia en humanos (Gonzales-Arimborgo *et al.*, 2016), sin embargo en otras investigaciones se prefiere la vía intraperitoneal por su facilidad en la aplicación en animales experimentales y para evitar el metabolismo hepático (D'Arrigo *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2007). Hasta la fecha no se ha realizado un estudio comparativo de ambas vías para conocer la efectividad de la mejor además queda por clarificar si la maca para actuar debe ser metabolizada durante su pasaje por la vía gastro-intestinal.

2.2 Pregunta de investigación

Pregunta 1: ¿El tamaño de los hipocótilos de maca influye en la respuesta biológica?

Pregunta 2: ¿El pH de la maca influye en la respuesta biológica?

Pregunta 3: ¿Qué vía de administración (orogástrica e intraperitoneal) del extracto acuoso de maca presenta la mejor respuesta biológica?

2.3. Hipótesis

Hipótesis 1: La administración de extracto acuoso de maca amarilla de primera categoría (maca de mayor tamaño) mejore el conteo de espermatozoides.

Hipótesis 2: La respuesta biológica medida como conteo de espermatozoides será mejor en medio ácido que en medio alcalino.

Hipótesis 3: La respuesta biológica será efectiva luego de la ingesta oral del tratamiento a diferencia de la administración vía intraperitoneal.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

- Evaluar efecto del extracto acuoso de cuatro categorías de maca amarilla sobre la respuesta biológica.
- Evaluar el efecto del pH del extracto acuoso de la categoría de maca amarilla de mejor respuesta biológica.
- Evaluar el efecto de la vía de administración del extracto acuoso hervido de maca sobre la respuesta biológica.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar el recuento espermático entre las cuatro categorías de maca amarilla.
- Evaluar el recuento espermático en testículo, epidídimo y conducto deferente después del tratamiento con los extractos de diferentes pH.
- Evaluar el recuento espermático entre la vía de administración orogástrica e intraperitoneal.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú.

4.1. Animales experimentales

El diseño del presente estudio fue de carácter experimental. Se utilizaron en total 105 ratones adultos machos de la cepa Swiss de 2.5 meses de edad con un peso promedio de 36 g, estos estuvieron mantenidos en un número de 5 animales por jaula en un ambiente con una temperatura de 22°C, humedad relativa del 70%, aireación constante, con agua y alimento administrado en forma *ad libitum*. Fueron seleccionados de manera aleatoria y fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Oficina de Investigación Científica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 65552).

4.2 Maca

Los hipocótilos secos de maca amarilla fueron obtenidos del Distrito de Huallanca Provincia de Bolognesi, Departamento de Ancash, de la zona MGAT1P1530 del fundo Torres Parcela Regalado aproximadamente a 4200 msnm. Todos los hipocótilos crecieron y fueron recolectados desde ese lugar, posteriormente se retiraron las hojas, se limpiaron y dejaron bajo el sol para ser secadas por la incidencia de radiación ultravioleta para luego ser empacadas y enviadas hasta el lugar de estudio. Se utilizaron cuatro categorías según el tamaño del hipocótilo (de mayor a menor tamaño): Categoría Primera, Segunda, Tercera y Cuarta (**Figura 1**).

4.3. Preparación de los extractos acuosos

Para realizar los extractos acuosos de las cuatro categorías de maca, se procedió a la molienda de cada categoría, se añadieron 100 gramos de cada categoría y fueron hervidos en 2 litros de agua por 2 horas como se puede observar en la Fig. 4. Luego de enfriarse esta preparación, se procedió al filtrado con ayuda de un papel filtro, el líquido recuperado fue analizado para determinar los valores de pH, glucosa y medición de polifenoles totales.

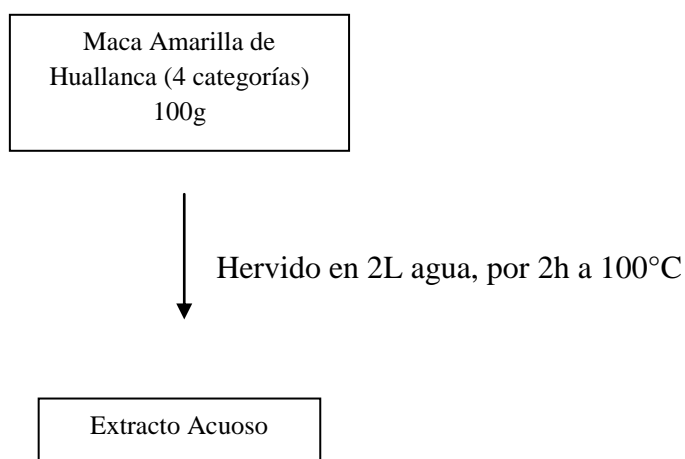


Fig. N° 4: Esquema de la preparación de Extracto acuoso de Maca

4.4. Definición de los Grupos de Estudio

4.4.1. Bioensayo 1 con pH acidificado (pH=4)

Para el primer bioensayo se utilizaron 35 ratones. Los animales fueron tratados con agua (control), con extracto atomizado de maca negra (control positivo) y con los extractos acuosos de las cuatro categorías de maca amarilla. Cuarta categoría: MA4, tercera

categoría: MA3, segunda categoría MA2 y primera categoría MA1 durante 3 días continuos por vía oral y un último grupo tratado (con MA1) por vía intraperitoneal IP, así mismo los pesos corporales fueron registrados al inicio y al final de los tratamientos. La acidificación de todos los tratamientos se realizó con ácido clorhídrico (HCl). Los tratamientos se observan también en la Tabla N°3

4.4.2. Bioensayo 2 con el pH natural (pH≈6)

Para el segundo bioensayo se utilizaron 35 ratones adultos machos de la cepa Swiss de 2.5 meses de edad los cuales fueron administrados con agua destilada (control), con extracto atomizado de maca negra (control positivo) y extractos acuosos de maca amarilla (pH=4) de las cuatro categorías incluido el grupo IP durante 3 días.

4.4.3. Bioensayo 3 con el pH alcalinizado (pH=8):

Para el tercer bioensayo se utilizaron 35 ratones adultos machos de la cepa Swiss de 2.5 meses de edad los cuales fueron administrados con agua destilada (control), con extracto atomizado de maca negra (control positivo) y extractos acuosos de maca amarilla (pH=8) de las cuatro categorías incluido el grupo IP durante 3 días. La alcalinización se realizó para todos los tratamientos con hidróxido de sodio (NaOH).

4.5. Sacrificio de los animales en estudio

Un día después de la finalización de los tratamientos, los animales fueron pesados y sacrificados por sobredosis de pentobarbital. Se extrajeron los órganos reproductivos tales

como los testículos, epidídimos y conductos deferente, seguido se registró el peso de estos órganos, posteriormente se procesó el testículo izquierdo para el conteo de espermátides, el epidídimo izquierdo y el conducto deferente para el conteo de espermatozoides (Gasco *et al.*, 2007; Yucra *et al.*, 2008).

BIOENSAYO 1 (pH=4)	BIOENSAYO 2 (pH≈6)	BIOENSAYO 3 (pH=8)
Control (n=5) vía oral	Control (n=5) vía oral	Control (n=5) vía oral
Control positivo (n=5) vía oral	Control positivo (n=5) vía oral	Control positivo (n=5) vía oral
Maca de 1° C. (n=5) vía oral	Maca de 1° C. (n=5) vía oral	Maca de 1° C. (n=5) vía oral
Maca de 2° C. (n=5) vía oral	Maca de 2° C. (n=5) vía oral	Maca de 2° C. (n=5) vía oral
Maca de 3° C. (n=5) vía oral	Maca de 3° C. (n=5) vía oral	Maca de 3° C. (n=5) vía oral
Maca de 4° C. (n=5) vía oral	Maca de 4° C. (n=5) vía oral	Maca de 4° C. (n=5) vía oral
Maca de 1° C. (n=5) vía IP	Maca de 1° C. (n=5) vía IP	Maca de 1° C. (n=5) vía IP

Tabla N°3: Tratamientos para los Bioensayos 1, 2 y 3

4.6. Administración de los extractos acuosos

La administración usual de maca negra en el laboratorio de Endocrinología y Reproducción es entre 5 – 10 mg por animal para que tenga un efecto positivo en la espermatogénesis en ratones; en esta ocasión se realizaron los cálculos de acuerdo al recuperado de cada hervido de las cuatro categorías y lo que hay en cada mililitro para homogenizar la concentración y darle al animal 5mg de extracto en 0.5 ml tal y como se muestra en la **Tabla 4**. La administración de maca negra fue administrada en la misma dosis que las cuatro categorías de maca amarilla y se realizó como control positivo para comparar los efectos biológicos con las demás macas. Cada tratamiento (Control, Control

+, MA4, MA3, MA2, MA 1 e IP) fue administrado a los animales vía oral durante 3 días continuos con una sonda gástrica N° 18 en un volumen de 0.5 mL por cada animal.

Categoría	Peso inicial de maca (g)	Volumen final post hervido (ml)	mg de maca en cada ml de extracto acuoso	Dilución ml (acuoso)/ml de agua	Concentración de maca en medio mililitro (mg)
Cuarta	100	2050	33.7	14.85 / 35.15	5
Tercera	100	2440	34.3	14.6 / 35.4	5
Segunda	100	2425	27.1	18.5 / 31.5	5
Primera	100	1670	26.7	18.75 / 31.25	5

Tabla N°4. Calculo de la administración homogénea de cada categoría de maca amarilla.

4.7. Evaluación del pH, Glucosa, polifenoles y DPPH

Para la evaluación del pH se utilizó un pHmetro marca Hanna calibrado en todo el rango del pH de 1 a 14. Para esto, el electrodo del equipo fue sumergido en una solución de 1g de maca molida (de las cuatro categorías) en 10ml de agua y se tomó de la misma manera el pH del agua en el que fueron preparados los extractos. Para la medición de glucosa, se utilizó un equipo *Accucheck*, una gota de cada extracto acuoso fue colocada en cada tira reactiva del equipo y se registró el resultado de los valores de la glucosa en mg/dL.

Los niveles de polifenoles fueron determinados usando el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método descrito por Kähkönen y colaboradores (1999) con ciertas modificaciones. En tubos de ensayo se colocaron 300 µL de los extractos acuosos de maca de las cuatro categorías (triplicado) seguido por 1.5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 5 veces) y 1.2 mL de carbonato de sodio (7.5 gr/100 mL). El contenido de los

tubos fue mezclado y guardado en la oscuridad por 30 minutos. La absorbancia fue medida a 760 nm usando un espectrofotómetro UV. El contenido total de fenoles se expresará como equivalentes al ácido gálico.

La actividad antioxidante fue medida mediante el ensayo de DPPH para los extractos acuosos de las cuatro categorías de maca. 2.5 mg de DPPH se diluyeron en 100 ml de metanol. Se midió la absorbancia a 515 nm del DPPH en el tiempo cero, y de ahí se agregó el extracto a evaluar y se midió la absorbancia cada 2.5 minutos hasta llegar a los 10 minutos. Se realizó una curva de calibración utilizando el ácido ascórbico. Se calculó el delta de la absorbancia para cada extracto. Los resultados se encuentran expresados como umol de ácido ascórbico por gramo de extracto.

4.8. Conteo de espermatozoides

Una vez que los animales fueron sacrificados, se cortó la piel y con cuidado se extrajo el testículo derecho junto al epidídimo, luego se separó el testículo izquierdo con el conducto deferente intacto, el cual se extrajo completo a nivel de las vesículas seminales. Finalmente, se extrajeron las vesículas seminales. Todos estos órganos fueron pesados en seco (con papel toalla) y posterior a ello colocados en placas de plástico conteniendo suero fisiológico. Inmediatamente después, cada ratón fue depositado en papel dentro de una bolsa roja. Antes de trabajar con los testículos y epidídimos, estos fueron pesados en seco al igual que los conductos deferentes.

4.8.1. Conteo de espermatozoides en Conducto Deferente

El conducto deferente izquierdo, se colocó en una placa de plástico conteniendo 1 ml de suero fisiológico, luego el conducto deferente fue seccionado en diminutas partes; después de 5 minutos se le colocó 1 ml de solución de eosina al 0.2% (diluida con suero fisiológico). Con una pipeta se homogenizó todo el contenido de la placa y se extrajo 0.9ul con una micropipeta el cual fue colocado en una cámara de recuento de Neubauer mejorada de marca ®Marienfeld Superior. Se contaron las cabezas con cola y sin cola de los espermatozoides, realizándose cuatro recuentos en total.

4.8.2. Conteo de espermatozoides en Testículo

Para la medición de la producción diaria de espermatozoides (PDE) se utilizó el testículo izquierdo por cuestiones de estandarización y se retiró cuidadosamente la túnica albugínea. Se homogenizó el testículo izquierdo en 1 ml de TRITON™ X-10 (al 5% en suero fisiológico), luego se realizó una dilución de 1/10 y también con una solución de TRITON™ X-10 al 0.05% en una placa Petri.

La medición de espermátides en el testículo se realizó cuatro veces usando una cámara de recuento de Neubauer mejorada de marca ®Marienfeld Superior. La PDE y su eficiencia (espermatozoides x/g. testículo) se determina dividiendo el número de espermátides elongadas por testículo y espermátides por gramo de testículo por 4.84 días del tiempo que dura la espermatogénesis. (Thayer *et al.*, 2001).

4.8.3. Conteo de espermatozoides en Epidídimo

Se extirparon y pesaron los epidídimos en seco. Se seccionan en dos partes, cabeza-cuerpo y cola. El conteo espermático epididimal resistentes a la homogenización de ratón no perfundido se realizó según lo descrito por Gonzales y colaboradores (2006). Se realizó

el homogenizado y se colocó en 1 mL de solución fisiológica (NaCl al 0.9%) en un tubo. Los homogenizados se mantuvieron refrigerados a 4 °C durante 24 horas, esto para facilitar la lisis del tejido y obtener la liberación total de espermatozoides.

Luego de retirarse de la refrigeradora, se colocaron en el tubo del homogenizado 1 mL de eosina al 2%. Se realizó en otro tubo una dilución adicional en la proporción de 1:4 con una solución de eosina. Se obtuvieron finalmente dos tubos para el epidídimo, uno de la cabeza-cuerpo y otro de la cola. De esta dilución se extrajo con una micropipeta 10 uL en una cámara de recuento de Neubauer mejorada de marca ®Marienfeld Superior y se contaron las cabezas coloreadas que hay en 25 cuadrantes utilizando, un microscopio de luz, en el objetivo de 40X por cuatro veces. El conteo espermático valor obtenido por cada animal evaluado se multiplica por 0.04x y luego por 2 mL para obtener valores expresados como espermatozoides/epidídimo.

4.9. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad mediante el método de exploración de las variables, determinándose valores de $P > 0.05$, indicando que los datos siguen una curva de distribución normal, luego se realizó la prueba de ANOVA de un factor y se consideró un $P < 0.05$ como significativo respecto al grupo control. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el paquete estadístico SPSS versión 22.0.

V. RESULTADOS

5.1. pH, glucosa, polifenoles y DPPH de los extractos acuosos de maca

Los valores de pH para los extractos acuosos de maca amarilla son ligeramente ácidos y varían entre 5.8 hasta 6.3; las categorías primera y segunda presentan los valores más ácidos con respecto a las demás categorías. Los valores de glucosa son menores para la primera categoría y más altos en los de cuarta categoría o de menor tamaño de los hipocótilo. En la evaluación del contenido de polifenoles se observa que la primera categoría tiene los más altos valores, mientras que las categorías primera y tercera presentaron mayor actividad antioxidante en la prueba de DPPH. Los valores se muestran en la **Tabla 4**.

	MN	MA1 (X±S)	MA2 (X±S)	MA3 (X±S)	MA4 (X±S)	Agua d (X±S)
pH	5.9	5.8±0.05	6±0.02	6.1±0.01	6.3±0.03	6.9±0.04
Glucosa (mg de glucosa x g de maca)		50.0	20.7	15.6	18.9	
Polifenoles (ug/ml)		0.51±0.03	0.38±0.02	0.33±0.04	0.36±0.02	
DPPH (%Act.Antiox.)		18.4±0.3	16.2±0.5	18.9±0.5	17.8±0.89	

X: Promedio; S: Desviación Estándar ANOVA < 0.01 para el pH de todas las categorías de maca amarilla vs agua destilada.

Tabla N°4: Valores de pH, glucosa, polifenoles y DPPH para las cuatro categorías de maca amarilla.

5.2. Efecto sobre el peso corporal y de órganos

El tratamiento con los extractos acuosos con pH normal, acidificado y alcalino de las diferentes categorías de maca amarilla mostraron un leve aumento de peso en todos los grupos, sin embargo no se observan diferencias en el peso corporal entre grupos, ni en el valor basal ni en el valor post-tratamiento ($p>0.05$ entre grupos). Para los tres bioensayos, el tratamiento con los extractos de las diferentes categorías de maca amarilla no afectó el peso corporal de los ratones ni de los diferentes órganos reproductivos evaluados ($p>0.05$ respecto al grupo control) tal como se muestra en la **Tabla 5**

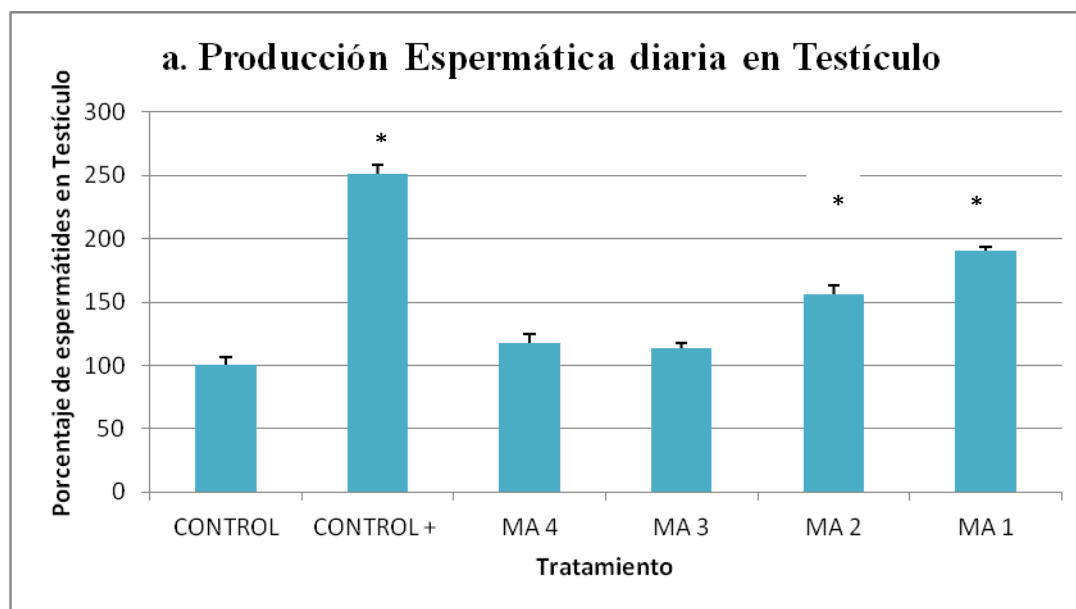
		PESO CORPORAL (g)		PESO DE ÓRGANOS (g)				
		Inicial	Final	Testículo		Epidídimo		Vesícula S.
				Izq.	Der.	Izq.	Der.	
Bioensayo 1	MA 1	34.6±1.1	35±10	0.116±0.012	0.121±0.011	0.050±0.007	0.052±0.004	0.366±0.083
	MA2	35±0.7	36.6±0.5	0.115±0.011	0.112±0.010	0.054±0.005	0.052±0.005	0.365±0.065
	MA3	35±0.7	35.6±0.5	0.114±0.007	0.117±0.006	0.053±0.010	0.057±0.007	0.365±0.057
	MA4	35.2±0.8	35.6±0.9	0.117±0.016	0.128±0.021	0.053±0.009	0.046±0.007	0.331±0.066
	IP	34.4±0.5	34.6±0.9	0.106±0.007	0.110±0.008	0.058±0.006	0.051±0.005	0.387±0.083
	C	35.6±0.9	35.8±1.1	0.126±0.009	0.122±0.010	0.051±0.008	0.058±0.008	0.412±0.037
	C+	35.2±0.8	35.6±0.5	0.116±0.012	0.120±0.011	0.050±0.009	0.054±0.009	0.391±0.059
Bioensayo 2	MA 1	31.6±1.1	33±1.2	0.118±0.012	0.120±0.011	0.049±0.005	0.052±0.003	0.393±0.069
	MA2	31.8±2	33.6±2.2	0.117±0.010	0.113±0.009	0.051±0.005	0.049±0.007	0.357±0.068
	MA3	31.8±1.5	33±20	0.112±0.009	0.116±0.007	0.052±0.010	0.054±0.009	0.354±0.027
	MA4	32±2.3	33.8±2.2	0.113±0.015	0.118±0.018	0.048±0.004	0.045±0.006	0.369±0.084
	IP	32±1.6	33.8±2.2	0.106±0.007	0.112±0.008	0.058±0.006	0.051±0.005	0.368±0.058
	C	32.2±1.8	33±1.9	0.129±0.006	0.126±0.014	0.052±0.010	0.055±0.006	0.416±0.037
	C+	32.2±0.8	33.8±0.8	0.117±0.008	0.12±0.009	0.052±0.008	0.054±0.008	0.371±0.035
Bioensayo 3	MA 1	27.2±0.8	27.4±0.5	0.108±0.003	0.110±0.009	0.050±0.004	0.051±0.005	0.365±0.056
	MA2	27.4±1.5	28.4±1.5	0.095±0.012	0.100±0.011	0.066±0.043	0.048±0.005	0.366±0.044
	MA3	27.8±1.3	29±10	0.102±0.009	0.105±0.004	0.049±0.008	0.050±0.007	0.437±0.056
	MA4	30.2±1.3	31.8±1.3	0.063±0.011	0.101±0.019	0.050±0.006	0.058±0.008	0.290±0.102
	IP	27±1.2	27.8±1.1	0.106±0.007	0.112±0.010	0.058±0.006	0.051±0.005	0.387±0.083

	C	32±1.9	33±1.4	0.105±0.019	0.111±0.017	0.048±0.004	0.047±0.004	0.257±0.038
	C+	32±1.2	32.8±0.8	0.113±0.013	0.114±0.013	0.048±0.002	0.050±0.002	0.257±0.071

Tabla N°5: Pesos corporales y de órganos para los tres bioensayos. X: Promedio; S: Desviación Estándar

5.3. Efecto de la maca sobre el conteo espermático en el Bioensayo 1 (pH=4)

La figura 5 muestra el aumento significativo de la producción espermática diaria en testículo y conteo espermático en conducto deferente y epidídimo, principalmente en el tratamiento con maca negra atomizada (CONTROL +) y extracto acuoso de maca amarilla de primera categoría (MA1), seguido de la segunda categoría (MA2).



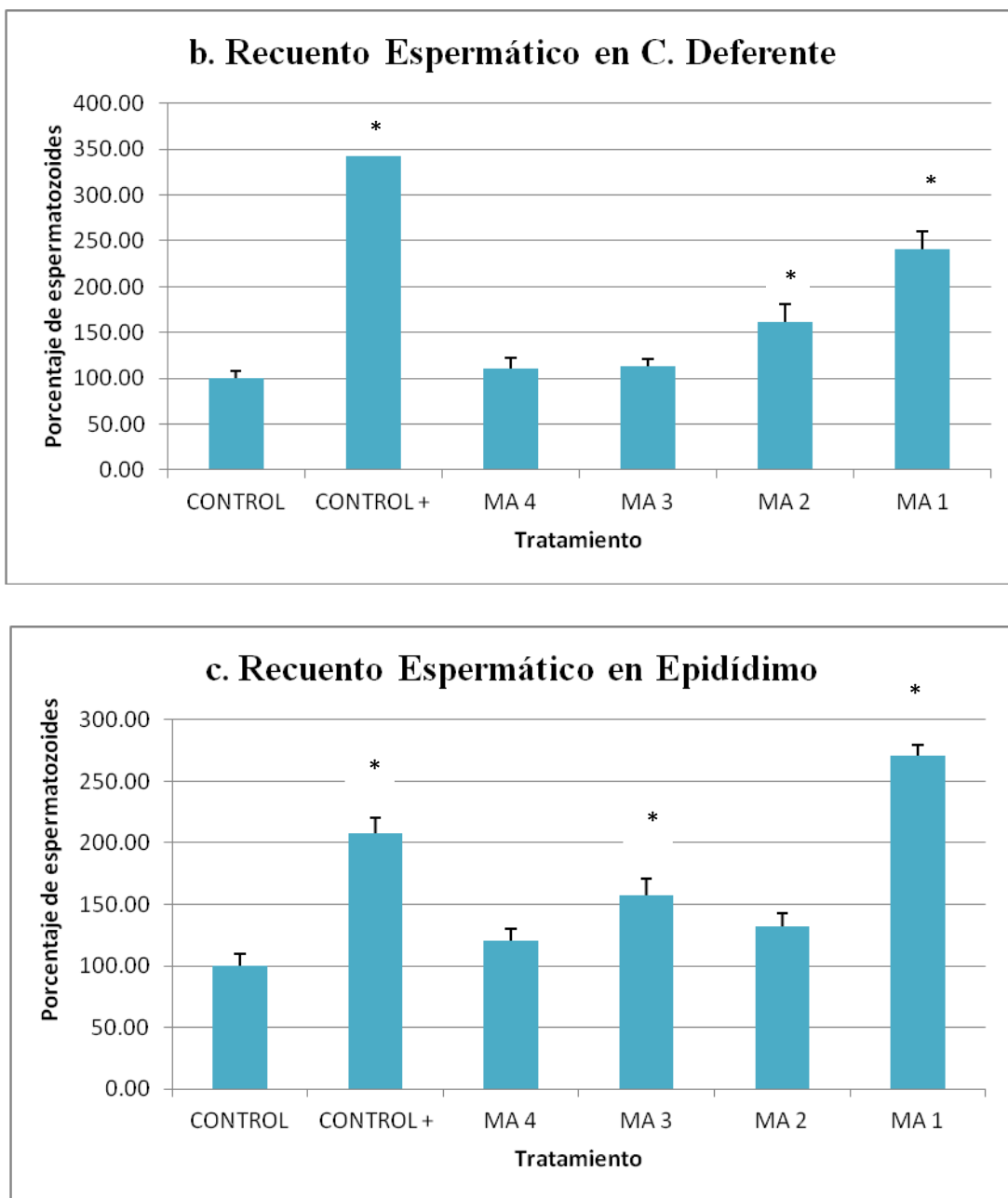


Fig. N° 5: Producción Diaria de Espermatozoides en testículo (a), recuento espermático en conducto deferente (b) y epidídimo (c) para el Bioensayo 1. *P<0.05 respecto al grupo control. Las barras indican las medias±error estándar.

5.4. Efecto de la maca sobre el conteo de espermatozoides en el Bioensayo 2 (pH≈6)

La figura 6 muestra un aumento significativo en el recuento espermático en aquellos grupos tratados con maca negra atomizada (CONTROL +), seguido con el tratamiento con extracto acuoso de maca amarilla de primera categoría (MA 1).

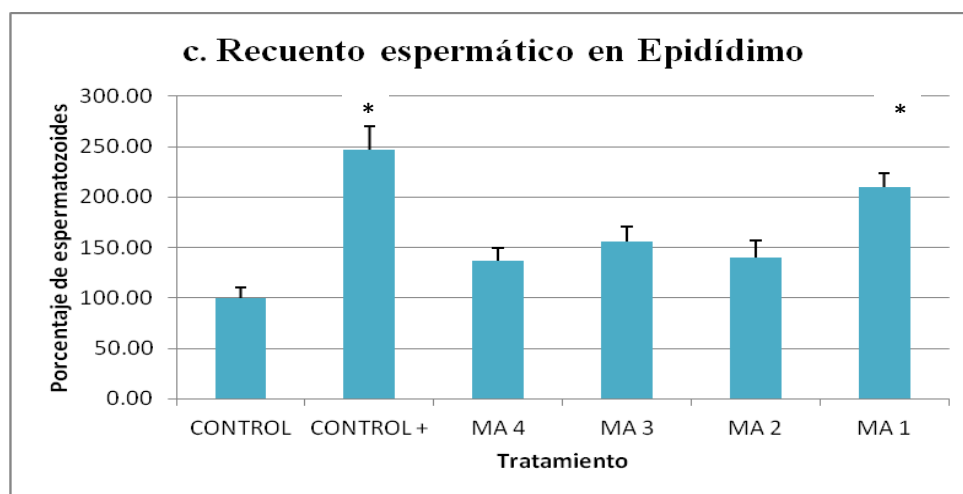
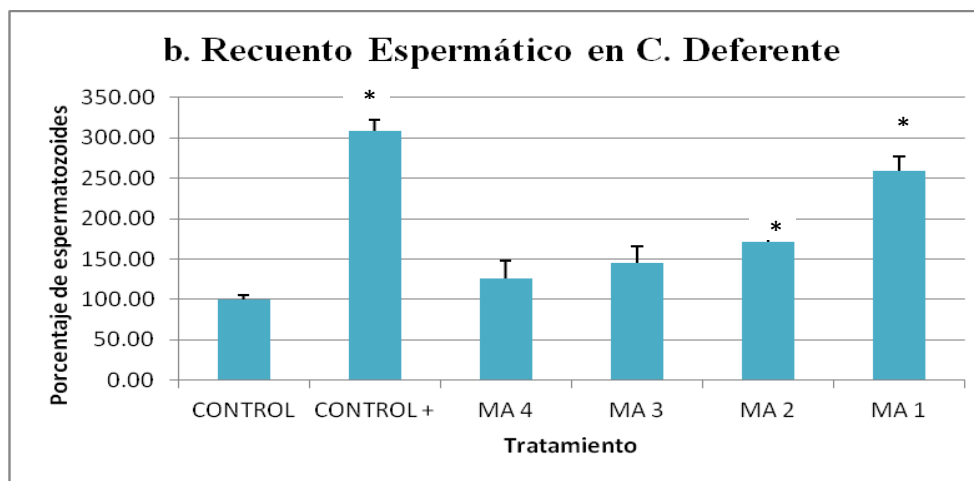
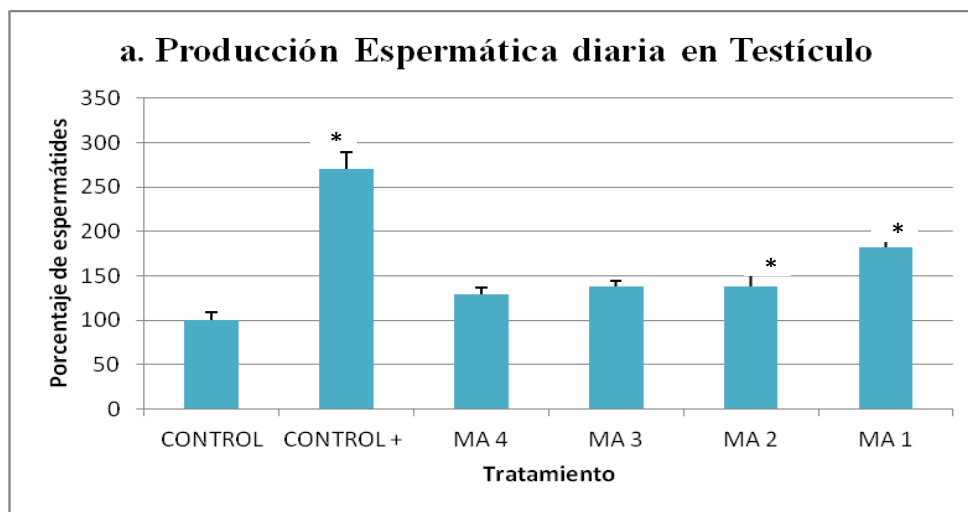
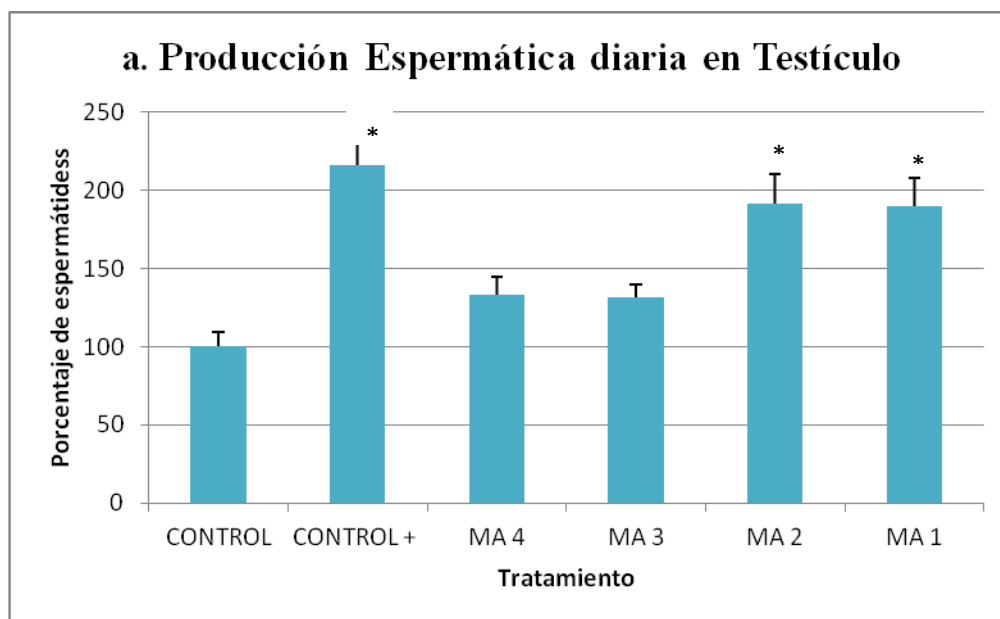


Fig. N° 6. Recuento de espermatozoides en testículo, conducto deferente y epidídimo de ratón tratados con maca amarilla de cuatro categorías. *P<0.05 respecto al grupo control. Las barras indican las medias±error estándar.

5.5. Efecto de la maca sobre el conteo de espermatozoides para el Bioensayo 3 (pH=8)

El gráfico 7 muestra un aumento significativo en el recuento espermático en aquellos grupos tratados con maca negra atomizada (CONTROL +), seguido con el tratamiento con extracto acuoso de maca amarilla de primera categoría (MA 1).



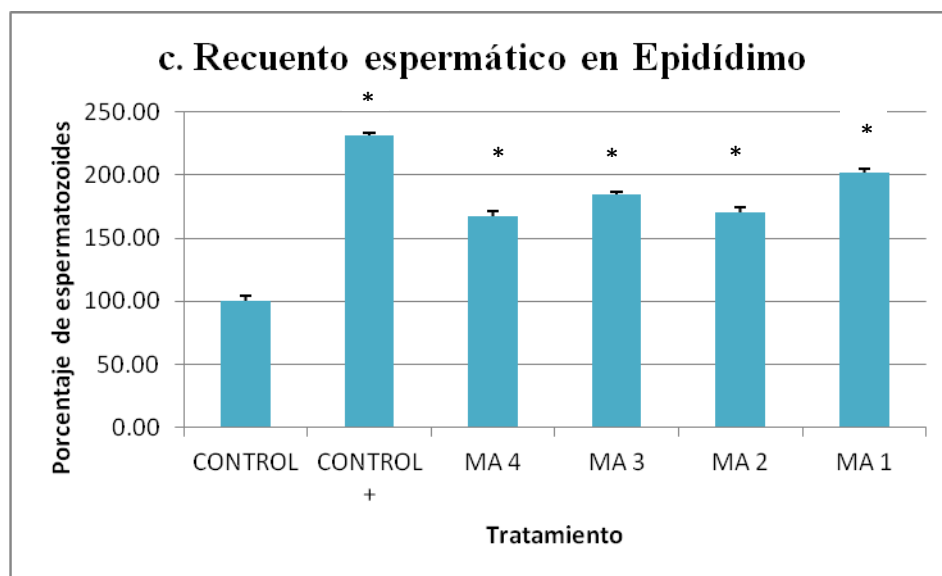
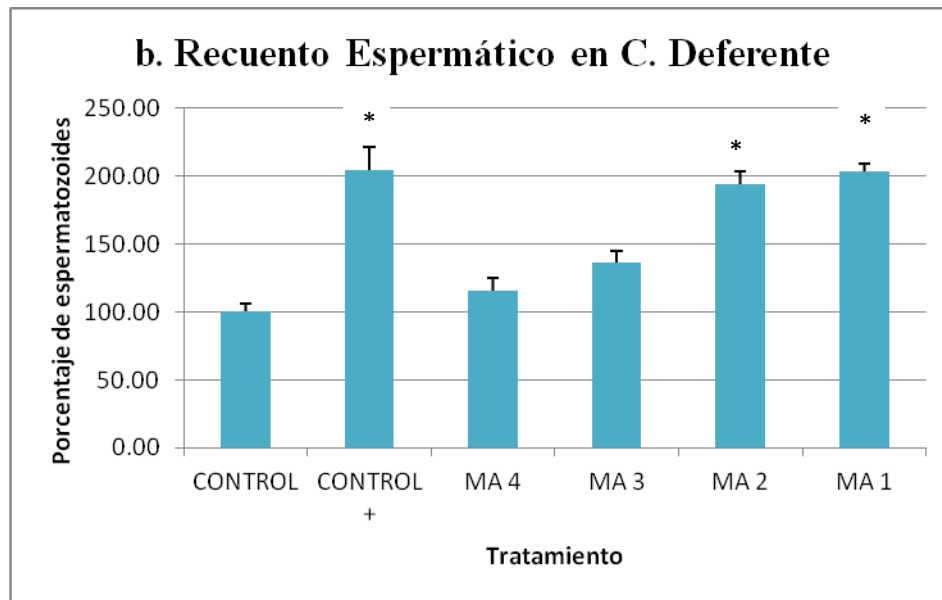
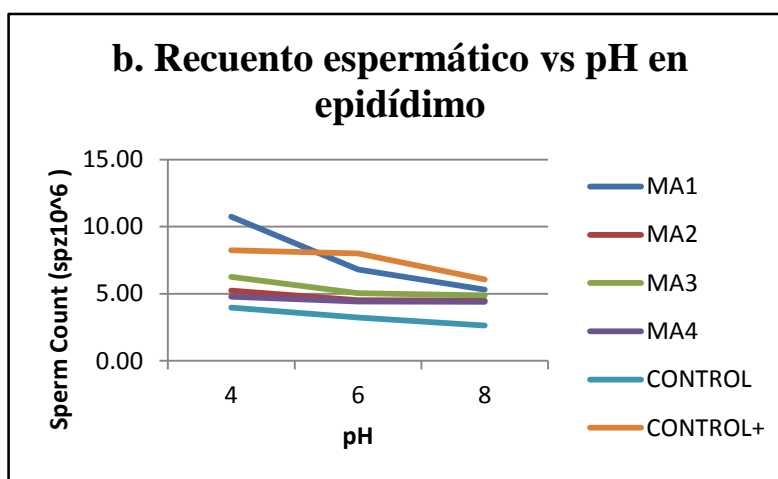
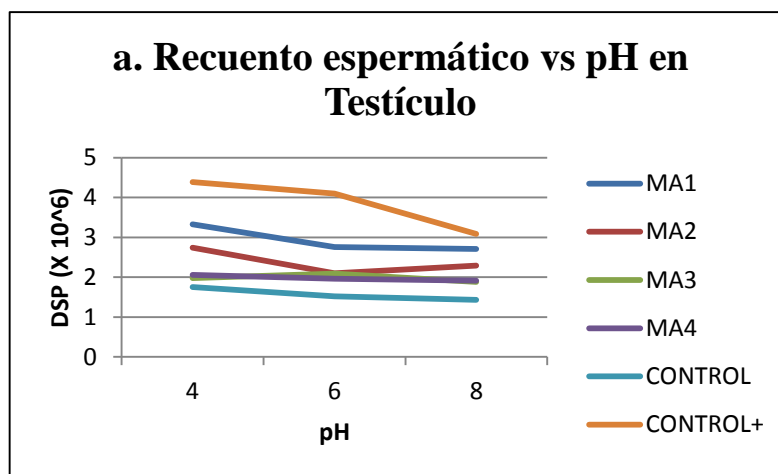
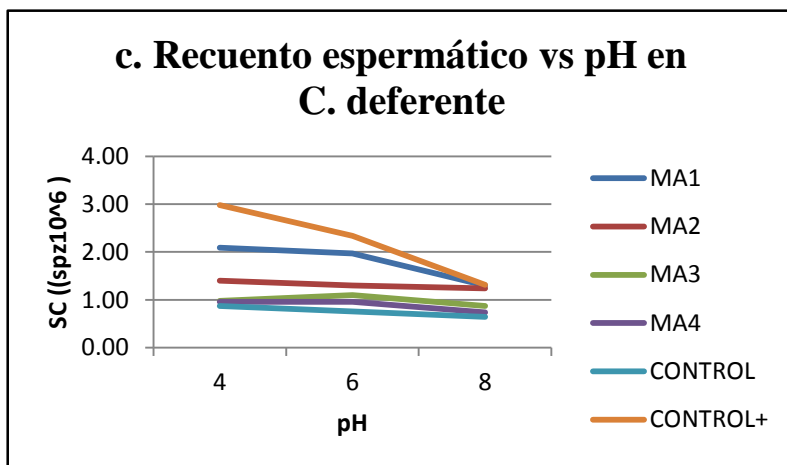


Fig. N° 7: Recuento de espermatozoides en testículo, conducto deferente y epidídimo de ratón tratados con maca amarilla de cuatro categorías. *P<0.05 respecto al grupo control. Las barras indican las medias±error estándar.

5.6. Efecto del pH en el Recuento espermático

Para todos los grupos de tratamiento, tanto en testículo, conducto deferente y epidídimo, con el pH acidificado (pH=4) presentaron un mejor efecto aumentando el número de espermatozoides a diferencia de los grupos tratados con extractos alcalinizados (pH=8), dichos resultados se pueden observar en el gráfico N°8.

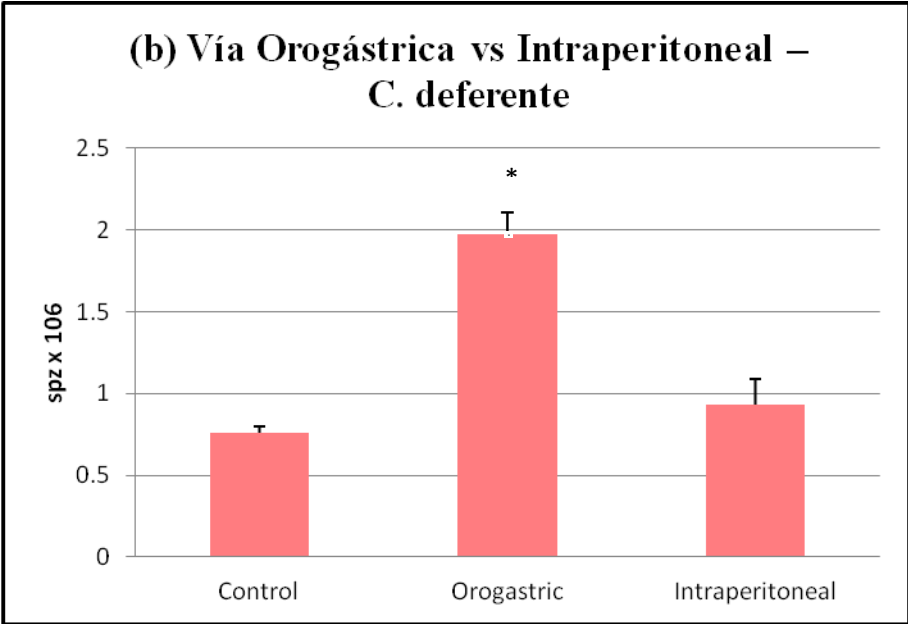
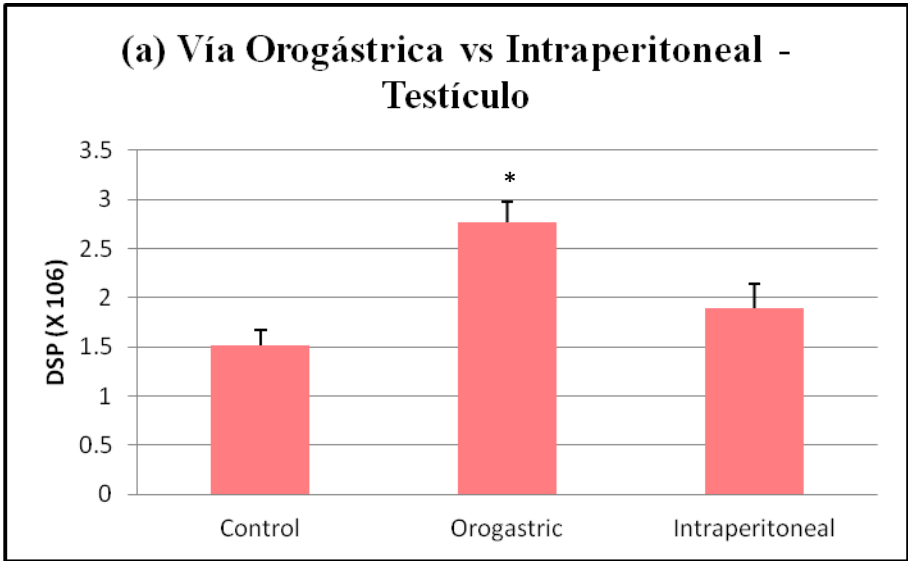




.Fig. N°8: Conteo espermático en testículo (a), conducto deferente (b) y epidídimo (c) a diferentes pH.

5.7. Efecto de las vías de administración

La figura muestra las diferencias en el recuento espermático en testículo, conducto deferente y epidídimo después del tratamiento de tres días con extracto acuoso de maca amarilla administrado por vía orogástrica y por vía intraperitoneal. Tanto la vía intraperitoneal como orogástrica recibieron extracto de maca de primera categoría. Por vía orogástrica el recuento espermático aumenta significativamente para todos los órganos y glándulas a comparación del control (agua destilada por vía orogástrica) **P<0.05** y la vía intraperitoneal. El efecto biológico de aumentar el conteo de espermatozoides sólo se observa cuando se administra el extracto de maca por vía oral.



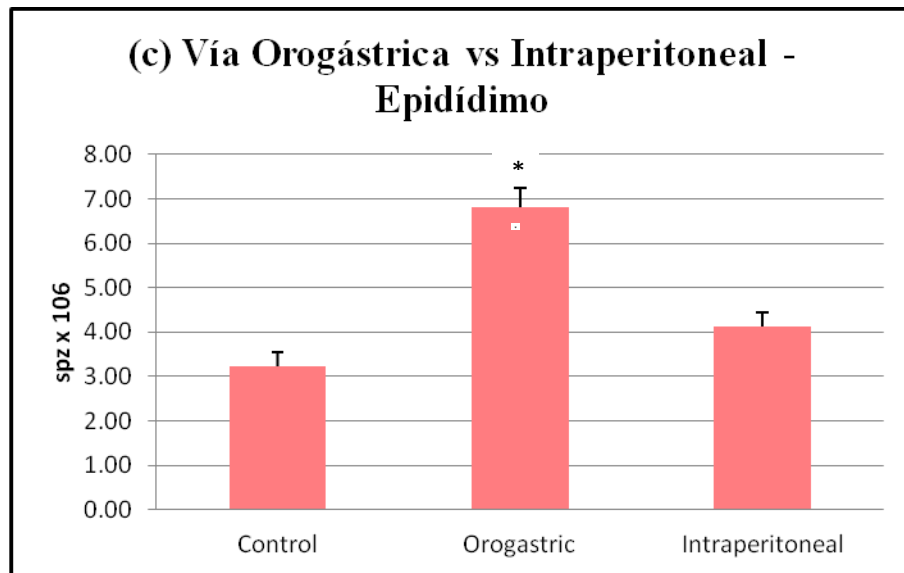


Fig. N°9: Comparación de dos vías de administración: Orogástrica vs Intraperitoneal en testículo (a), epidídimo (b) y conducto deferente (c) de ratón tratados con maca amarilla de cuatro categorías. * $P < 0.05$ respecto al control. Las barras indican las medias \pm error estándar.

5. DISCUSIÓN

La maca, una planta que crece en las zonas altoandinas particularmente de los Andes centrales aledaños a la Meseta de Bombón, ha mostrado un interés muy grande a nivel internacional tanto por sus propiedades nutritivas como funcionales (Cobo, 1653; Zheng *et al.*, 2000;). En los años noventa del siglo pasado la maca tuvo un boom por el interés de los mercados internacionales por sus propiedades afrodisiacas. Ello determinó que el gobierno peruano intentara ampliar las zonas de cultivo particularmente en las zonas altoandinas del sur en su creencia de una alta tolerancia a las bajas temperaturas. Los resultados fueron decepcionantes pues los cultivos no tuvieron el rendimiento esperado. Sin embargo, a medida que las condiciones ambientales están cambiando en la actualidad, otras zonas con similares características a Junín o Cerro de Pasco podrían ofrecer una similar cosecha. Nuestros resultados muestran que la maca de Huallanca (Ancash) tiene efecto biológico similar al observado en la maca cultivada en la zona de Junín. Un estudio reciente muestra que la maca de Huallanca produce hipocótilos de menor tamaño que los de Junín (O.Meissner *et al.*, 2016).

Con respecto a los parámetros medidos adicionalmente, se sugieren que la actividad biológica de la maca también podría deberse a la actividad antioxidante y la cantidad de polifenoles totales. (Lee *et al.*, 2005; Castillo, *et al.*, 2005 and Oré *et al.*, 2008). Comparando las cuatro diferentes categorías, la maca de primera categoría mostró tener el mayor contenido de polifenoles y uno de los mayores porcentajes de actividad antioxidante por la prueba de DPPH. A su vez se midió la cantidad de glucosa para cada una de las categorías de maca, la maca de primera categoría presentó mayor cantidad de glucosa por gramo, esto podría deberse a la cantidad de almidón presente, el cual forma la mayor parte del contenido de carbohidratos contenido en los hipocótilos grandes, en cambio los hipocótilos de menor tamaño presentarían menor cantidad de almidón y un alto contenido de fibras, asociados a una poca cantidad de glucosa en los alimentos. La fibra retarda la

absorción de glucosa (Riccardi & Rivellese, 1991) La fibra es un componente estructural de la pared celular de los vegetales (Kay, 1982)

EFFECTO DEL TAMAÑO DEL HIPOCÓTILO

Un estudio en Arequipa muestra que las fitohormonas son importantes para el mayor tamaño de hipocótilos de tara (Bustamante *et al.*, 2012). Las auxinas, giberelinas y citoquinas son fitohormonas producidas naturalmente por la planta, encargadas de los fenómenos de crecimiento y desarrollo (Lazo, 1981). A medida que se aumenta la concentración de fitohormonas están logran estimular el crecimiento de los hipocótilos. Por lo tanto, el mayor tamaño de los hipocótilos de maca podría deberse a una mayor concentración de fitohormonas que modulan el crecimiento, mientras que una menor concentración de estas ocasionaría un efecto inhibitorio en el crecimiento y tamaño total de los hipocótilos.

Otra posible causa es el tamaño de la semilla; diversos estudios muestran que una semilla de mayor tamaño con gran cantidad de reservas produce una plántula vigorosa, con un mejor desarrollo y tamaño que una semilla pequeña (Jiménez *et al.*, 2014; Rubio-Licon *et al.*, 2011). Un estudio con *Allium sativum L* (ajo), muestra que mientras más corto sea el tiempo de germinación de la semilla, la planta tendrá mayor probabilidad de captar más nutrientes por la baja competencia por recursos en el microambiente generando mayor tamaño del bulbo y tamaño de hojas (Karaye & Yakube, 2006).

En el caso de la maca de mayor tamaño, la nutrición que tuvo durante el tiempo de crecimiento fue mayor en el parénquima reservante, concentrándose una mayor cantidad de metabolitos primarios y/o secundarios, en cambio los hipocótilos de menor tamaño captarían la menor cantidad de nutrientes (minerales, vitaminas, metabolitos secundarios

responsables del efecto biológico), acumulando a su vez residuos no útiles que no le otorgarían el efecto biológico esperado. Estos resultados concuerdan con las afirmaciones de Burba (1997), indicando que el mayor peso del bulbillo grande del ajo es debido a la mayor cantidad de reservas que la planta de ajo acumula durante su crecimiento vegetativo. El tratamiento con extracto acuoso hervido de maca de primera categoría presentó el recuento espermático más alto en testículo, epidídimo y conducto deferente, por lo cual se concluye que el tamaño de los hipocótilos cumple un rol muy importante (pero no el único) en el efecto biológico de la maca.

EFFECTO DEL pH

Otro de los parámetros evaluados fue el efecto del pH sobre la respuesta biológica a la maca. Estudios previos han mostrado que a menor pH de la muestra de maca mayor es la actividad biológica (Gonzales, 2006). El presente estudio confirma estos hallazgos usando la maca obtenida de Huallanca. El suelo donde crece la maca es de naturaleza ácida (Quirós *et al.*, 1996) y por ello podría deberse el hecho que los hipocótilos obtenidos tendrían un pH ácido. En nuestro estudio, se evaluó si el pH ácido de los extractos influye en el conteo espermático, por lo que se comparó el efecto de extractos con diferentes pH, el pH inicial de las cuatro categorías se encontró en el rango de 5.8 a 6.3. Estos valores podrían deberse a los compuestos presentes en dichos extractos, junto al pH ácido del sustrato en donde crece la raíz otorgándole la resistencia necesaria a ambientes hostiles, mejores propiedades alimentarias y por lo tanto un mejor efecto biológico después del tratamiento.

En los bioensayos se observaron que un menor pH mejora la actividad de los metabolitos secundarios por lo que otorgaría un mejor efecto. Mientras tanto, el tratamiento con el extracto acuoso alcalinizado mostró una disminución del recuento espermático en todos los grupos lo que podría indicar que los metabolitos para adquirir actividad biológica en el tracto digestivo requieren del pH ácido.

El medio ácido es importante para activar la pepsina a nivel del estómago. El contener un alimento un pH ácido puede favorecer que el pepsinógeno liberado por las células principales o zimógenas se transforme en pepsina. Se ha demostrado que la fermentación de lactobacilos pueden formar lactotripeptidos que tienen propiedades funcionales como la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y con ello favorecer la reducción de la presión arterial (Jäkälä & Vapaatalo, 2010). En la maca también se ha demostrado esta propiedad de inhibir la ACE (Ranilla *et al.*, 2010). *Lactobacillus* es un cultivo probiótico como lo es el *Bifidobacterium*. En ese sentido se ha demostrado que la maca tiene un efecto al favorecer la supervivencia de *B. bifidum*. (León-Marrou, 2011).

Los glucosinolatos contienen grupos azufre, se componen de Thiohydroximate-O-sulfonato unido a glucosa y un grupo alquilo, aralquilo o indolilo (R) (Agerbirk & Olsen, 2012). Sus producto de degradación son los isotiocianatos los cuales son altamente biodisponibles (cantidad de moléculas que son administradas, que se absorben y llegan a la circulación), tras la conversión de Glucosinolatos a Isotiocianatos, esta se torna una molécula apolar, con la capacidad de atravesar las membranas celulares de forma sencilla (Choi *et al.*, 2014) hasta llegar a la circulación. La absorción se da a nivel intestinal, el pH del intestino del ratón es de 5.2. Otros de los productos de degradación de los glucosinolatos es el indol-3-carbinol que en medio ácido se condensa en compuestos aromáticos policíclicos. La formación de nitrilos se favorecida por el pH ácido. Mientras que a pH neutral se favorece la formación de isocianatos (Barba *et al.*, 2016) Estos metabolitos activos a nivel del hipotálamo estimularán a las hormonas gonadotrópicas para que la FSH estimula la producción de andrógenos aumentando el recuento espermático.

Sin embargo, en los últimos años existe un mayor interés por los alimentos alcalinos; por lo que se recomienda disminuir la dieta ácida (Scialla & Anderson, 2013). La dieta es un determinante importante de la carga ácida que el riñón debe excretar para mantener el equilibrio ácido-base. Tras consumir un alimento ácido este es neutralizado por la

glutamina, el resto de ácido se neutraliza o se almacena dentro del cuerpo, hueso y músculo, células, y el bicarbonato en suero disminuye, esto contribuye a enfermedades cardiovasculares, óseas y la enfermedad renal crónica (Passey, 2017).

Sin embargo, la investigación de Guimarães (2017) evaluó los compuestos fenólicos en la capacidad antioxidante de la linaza, el cual fue potenciado por la digestión gastrointestinal simulada (favorecida por la acción de las enzimas digestivas). Los complejos proteíno-fenólico de la linaza favorecieron la exposición de restos proteínicos capaces de actuar como un antioxidante, que complementaría el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos, por lo que habría una relación positiva entre estas dos clases de compuestos. La maca de primera categoría obtuvo la mayor cantidad de polifenoles totales, por lo cual la maca más grande podría tener efecto en la protección fenólica contra la degradación oxidativa a lo largo del tracto gastrointestinal y el establecimiento de un entorno antioxidante positivo otorgándole mejores efectos biológicos como el aumento en el recuento espermático.

EFFECTO DE LA VIA DE ADMINISTRACIÓN

Nuestro estudio demuestra que la mejor ruta de administración fue la vía orogástrica sugiriendo que el pasaje gastro-intestinal promueve la producción o conversión de metabolitos secundarios inactivos a principios activos.

La maca contiene gran cantidad de glucosinolatos aromáticos, incluso más que la reportada en otras crucíferas (Li et al., 2001), son compuestos nitrógeno-azufrados los cuales se encuentran inicialmente en su forma inactiva. Después de la ingesta de maca por seres humanos o roedores por el tracto gastrointestinal, los glucosinolatos se convierten en isotiocianatos (metabolitos de forma activa) por la microflora intestinal o por acción de la

enzima mirosinasa obtenida de la dieta (Rouzaud et al., 2003), paralelamente, ocurre una hidrólisis y se producen bencilaminas (metabolitos activos). Siendo los responsables de los efectos biológicos aquellos productos obtenidos de la degradación de los glucosinolatos. En un estudio realizado en el 2005 por Sharma, se demuestra que la curcumina a pesar de tener una baja disponibilidad después de la ingesta por vía oral, en el pasaje gastro-intestinal favorece que se puedan alcanzar niveles biológicamente activos.

Nuestro hallazgo es importante pues indica que los compuestos presentes en la maca como tal no tienen efecto sobre el conteo de espermatozoides y que necesitan de su pasaje en la vía gastrointestinal para su conversión en principios biológicamente activos.

En muchos estudios farmacológicos se muestra que la vía intraperitoneal es la preferida porque favorece una mejor absorción de los principios activos (Chan *et al.*, 2014), además la absorbancia y el metabolismo de estos, pueden afectar a sus concentraciones y las estructuras *in vivo*. (Sharma *et al.*, 2005; Memmott *et al.*, 2010). Sin embargo también pueden sufrir metabolismo hepático antes de llegar a la circulación, además que una cantidad del tratamiento administrado podría perderse pasando a la linfa torácica (Abu *et al.*, 1995). En resumen los resultados del presente estudio demuestran que la maca de Huallanca es tan efectiva como la maca de Junín, siempre y cuando tengan el tamaño más grande (primera categoría y segunda), se confirma que el pH ácido mejora la actividad biológica de la maca y que para su acción se requiere su pasaje por vía gastrointestinal.

6. CONCLUSIONES

- La maca de primera categoría presentó el mejor efecto biológico.
- El pH ácido mejora la actividad biológica de la maca favoreciendo la actividad antioxidantes de los componentes fenólicos.
- Para que la maca cumpla su función se requiere de su pasaje por vía gastrointestinal, activando los metabolitos secundarios.

7. REFERENCIAS

1. Abu-Hijleh MF, Habbal OA, Moqattash ST. 1995. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J Anat* 186:453–467.
2. Agerbirk N, Olsen CE. Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* (2012) 77:16–45.10.1016/j.phytochem.2012.02.005.
3. Berłowski A, Zawada K, Wawer I, Paradowska K. Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences*. 2013;4(8A):71-7.
4. Burba, J.L. (1997c). Control de calidad en ajos destinados al mercado externo. En: Burba, J.L. (ed.), pp. 58-68. *Cincuenta Temas Sobre la Producción de Ajo. Volumen 4*. La Consulta, Mendoza, Argentina.
5. Bustamante, G., Imata, J., Linares, L., Mostajo, D., Pacheco, R., Quispe, M., & Vilca, A. Efectos de las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) en el crecimiento de hipocótilos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “Tara”. UNSA, Arequipa. Perú. 2012
6. Castaño-Corredor, M. 2008. Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón): composición química y propiedades farmacológicas. *Revista de Fitoterapia* 8: 21-28.
7. Castillo P, Lock O. Compuestos con actividad antioxidante en la especie *Lepidium meyenii* (Walp). *Rev Soc Quim Peru*. 2005;71(4):227-36.
8. Chan Shu-Ting, Lin Yi-Chin, Chuang Cheng-Hung, Shiau Rong-Jen, Liao Jiunn-Wang, and Yeh Shu-Lan, Oral and Intraperitoneal Administration of Quercetin Decreased Lymphocyte DNA Damage and Plasma Lipid Peroxidation Induced by TSA In Vivo, *BioMed Research International*, vol. 2014
9. Choi, E., Zhang, P., & Kwon, H. (2014). Determination of Goitrogenic Metabolites in the Serum of Male Wistar Rat Fed Structurally Different Glucosinolates, *30*(2), 109–116.
10. 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(1-2):143-7.

11. Cobo B. History of the New World. Madrid: Biblioteca de Autores Españoles; 1956.
12. Cui B, Zheng BL, He K, Zheng QY. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. J. Nat.Prod 2003;66:1101-1103.
13. D'ARRIGO, Guadalupe; BENAVIDES, Víctor; PINO, José. Evaluación preliminar del efecto de *Lepidium meyenii* Walp en el desarrollo embrionario de ratón. **Rev. peru biol.**, Lima, v. 11, n. 1, jul. 2004.
14. Dini A, Migliuolo G, Ratrelli L. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. FoodChem 1994;49:347-9.
15. Donayre J. Effect of high altitude on spermatogenesis. Excerpta Medical International Congress 1968; 184:1054–1059.48.
16. Francisco J. Barba, Nooshin Nikmaram et al. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. Front Nutr. 2016; 3: 24.
17. Gasco M, Aguilar J, Gonzales GF. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. Andrologia. 2007;39(4):151-8.
18. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. J Ethnopharmacol. 2005 Feb 20;103(3):448-54.
19. Gonzales GF, Gasco M, Cordova A, Chung A, Rubio J, Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340m). J Endocrinol 2004; 180:87–95.
20. Gonzales GF, Rodriguez L, Valera J, Sandoval E & Garcia-Hjarles M. Prevention of highaltitude-induced testicular disturbances by previous treatment with cyproheptadine in male rats. Archives of Andrology 1990; 24:201–205.
21. Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. Asian J Androl. 2001; 3(3):231-3.
22. Gonzales GF. Cordova A, Gonzales C, Chung A, Vega K, Villena A. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. Asian J Androl 2001b; 3:301-303.

23. Gonzales GF. Maca de la Tradición a la Ciencia. CONCYTEC: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2006.
24. Gonzalez-Arimborgo C. Acceptability, Safety, and Efficacy of Oral Administration of Extracts of Black or Red Maca (*Lepidium meyenii*) in Adult Human Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Pharmaceuticals (Basel)* 2016 Aug 18;9(3). pii: E49. doi: 10.3390/ph9030049
25. Guimarães Drummond E Silva F, Miralles B, Hernández-Ledesma B et al. Influence of Protein-Phenolic Complex on the Antioxidant Capacity of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products. *J Agric Food Chem.* 2017 Feb 1;65(4):800-809.
26. Gutierrez H., et. al., Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelos: *Artemia franciscana* (Crustácea, Anostraca), pez Guppy (*Poecilia Reticulata*) y ratón (*Mus musculus*), *Rev. Horizonte Médico*, 2007; 7 (2):103-108
27. Jäkälä P¹, Vapaatalo H². Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Jan 19;3(1):251-272.
28. Janampa María, Gonzales Wilfredo. Eco-fisiología de *Lepidium meyenii* Walp. (maca): influencia del estrés térmico, hídrico, la altitud y la disposición del suelo sobre el desempeño de semillas procedente de hipocótilos de diferente color.
29. Johns T. The anu and the maca. *J. Ethnobiol* 1981;1:208-12.
30. Jiménez-Vázquez, P, Rangel-Lucio, JA, Mendoza-Elos, M, Cervantes-Ortíz, F, & Rivera-Reyes, JG. (2014). Efecto de tamaño del bulbo/bulbillo y densidad de plantación en la emergencia, rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.). *Phyton (Buenos Aires)*, 83(1), 83-91. Recuperado en 07 de marzo de 2017.
31. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J. et al. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 , 3954–3962.
32. Karaye, A.K. y I. Yakubu (2006). Influence of intra-row spacing and mulching on weed growth and bulb yield of garlic (*Allium sativum* L.) in Sokoto, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 5: 260-264.

33. Kay, R.M. (1982). Dietary fiber. *J. Lipid Res.*, 23,221-242.
34. Lazo, H,1981. Aislamiento e identificación de Sustancias parecidas a las Giberilina, presentes en la inflorescencia del Agave americana “Maguey” Arequipa-Perú.
35. Lee K-J, Dabrowski K, Rinchar J, et al. Supplementation of maca (*Lepidium meyenii*) tuber meal in diets improves growth rate and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) alevins and juveniles. *Aquac Res* 2004;35:215-23.
36. Lee KJ, Dabrowski K, Sandoval M, Miller MJS. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*. 2005;244:293-301.
37. León, J. 1964. The “Maca” (*Lepidium meyenii*), a little known food plant of Perú. *Economic Botany* Vol. 18:122-127.
38. León-Marrou E (2011). Efecto bifidogénico de jalea de *Lepidium meyenii* Walp. “maca” en el recuento de *Bifidobacterium bifidum* en yogurt probiótico. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2(1), 094-107.
39. Li G, Ammermann U, Quiroz CF. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *EconBot* 2001;55:255-62.
40. Memmott R. M., Mercado J. R., Maier C. R., Kawabata S., Fox S. D., and Dennis P. A., Metformin prevents tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis, *Cancer Prevention Research*, vol. 3, no. 9, pp. 1066–1076, 2010.
41. Mostacero, J. y Mejía, F. *Taxonomía de Fanerógamas Peruanas*. Concytec. Edit. Libertad. Lima, Perú. 1993.
42. O. Meissner H, Mscisz A, Piatkowska E, et al. Peruvian Maca (*Lepidium peruvianum*): (II) Phytochemical Profiles of Four Prime Maca Phenotypes Grown in Two Geographically-Distant Locations. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*. 2016;12(1):9-24.

43. Oré MR. Efectos hipolipémicos y antioxidante de *Lepidium meyenii* Walp en ratas [Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
44. ORÉ, Raquel et al. Efecto del extracto acuoso de maca sobre la función cognitiva en ratas recién destetadas. **Anales de la Facultad de Medicina**, [S.l.], v. 72, n. 1, p. 13-16, feb. 2013. ISSN 1609-9419.
45. Passey C. Reducing the Dietary Acid Load: How a More Alkaline Diet Benefits Patients With Chronic Kidney Disease. J Ren Nutr. 2017 Jan 20. pii: S1051-2276(16)30188-1.
46. Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* walp). *J Agric Food Chem*. 2002;50(20):5621-5.
47. Quirós, C.F.; Epperson, A.; Hu, J.; Holle, M. 1996. Physiological studies and determination of chromosome number in maca, *Lepidium meyenii* (Brassicaceae). *Economic Botany* 50: 216-223.
48. Ranilla LG¹, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol*. 2010 Jun;101(12):4676-89. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.093. Epub 2010 Feb 25.
49. Riccardi G, Rivellese AA. Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care*. 1991 Dec;14(12):1115-25. Review.
50. Rouzaud G, Rabot S, Ratcliffe B, Duncan AJ. Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotics rats.
51. Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44:1114–22.
52. Rubio-Licona, Liliana Elizabeth, Romero-Rangel, Silvia, Rojas-Zenteno, Ezequiel Carlos, Durán-Díaz, Ángel, & Gutiérrez-Guzmán, Julio César. (2011). Variación

- del tamaño de frutos y semillas en siete especies de encino (*Quercus*, Fagaceae). *Polibotánica*, (32), 135-151.
53. Scialla Julia, Anderson Cheryl. Dietary acid load: A novel nutritional target in chronic. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2013; 20(2):141-149.
 54. Sharma R. A., Gescher A. J., and Steward W. P. Curcumin: the story so far, *European Journal of Cancer*, vol. 41, no. 13, pp. 1955–1968, 2005.
 55. Sistema integrado de información de comercio exterior. SIICEX. (2015) Partidas arancelarias del producto, exportadas en los últimos años. Partida 1106201000. Disponible en: http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=172.17100&_portletid_=sfichaproductoinit&scriptdo=cc_fp_init&pproducto=%20116%20&pnomproducto=%20Maca
 56. Tello J, Hermann M, Calderón A. 1992. La Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivo Alimenticio Potencial para las zonas Altoandinas. *Boletín de Lima* 31: 59 - 66.
 57. Thayer KA, Ruhlen RL, Howdeshell KL, Buchanan DL, Cooke PS, Preziosi D, et al. (2001). Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17alpha-ethinyl oestradiol. *Human Reproduction* 16(5):988-996.
 58. Valerio L, Gonzales GF. Toxicological Aspects of South American Herbs: *Uncaria tomentosa* (Cat's claw) and *Lepidium meyenii* (Maca). A Critical Synopsis. *Toxicological Review* 2005;24:11-35.
 59. Yucra S, Gasco M, Rubio J, Nieto J, Gonzales GF. Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5 Suppl):1461-7. Epub 2007 Jul 31.
 60. Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Yu S, Huang ZY, et al. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. 2000;55(4):598-602.