

## ARTÍCULO ORIGINAL

**Asilamiento e identificación de un nuevo alcaloide de *Lepidium meyenii* Walpers.****Isolated and identification of a new alkaloid from species *Lepidium meyenii* Walpers.**

Guillermo Rocabado Calizaya<sup>1</sup>, Paulia Bermejo Benito<sup>2</sup>, MariaJosé Abat Martínez<sup>2</sup>, Luis Bedoya del Olmo<sup>2</sup>, Sandra Fuentes Villalobos<sup>1</sup>, Eduardo Gonzales Davalos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Angamos 0610, Antofagasta, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Séneca S/N Ciudad Universitaria, Madrid, España.

<sup>3</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224, La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Guillermo Rocabado Calizaya, Av. Angamos 0610 Antofagasta, Chile.  
Telf.: (005655-355434) – (005655-82649573).  
E mail: grocabado@ucn.cl

Recibido para publicación en 11/04/11

Aceptado en 15/06/11

**RESUMEN**

La especie *Lepidium meyenii* Walpers "maca", típica del altiplano de Bolivia, Perú y Chile, es usada por sus propiedades en el área de la salud atribuidas a la calidad y complejidad de sus compuestos químicos, los cuales son la base de esta investigación. El estudio de extracto hexánico de *L. Meyenii* determinó un rendimiento de 2,35% y el tratamiento con metanol de la fracción hexánica un rendimiento final de 0,45%, el cual fue sometido a cromatografía con objeto de caracterizar e identificar la presencia de alcaloides y alcalamidas, que son características de la familia Brassicaceae. Para el fraccionamiento cromatográfico se usaron diferentes técnicas en columnas de silicagel de 40 – 63 micras y placas preparativas LH-20. Para la identificación de la fracción aislada denominada G-2, fueron utilizadas métodos instrumentales como NMR-C13, H1 NMR, NMR-DEP, COSY, HMBC, HMQC, MS, IR y análisis elemental. La estructura química del compuesto determinada, no ha sido a la fecha aislada ni identificada en fuentes naturales y ésta podría ser la primera vez que se describe en *L. Meyenii*.

**Palabras Clave:** *L. meyenii* nuevo compuesto

**ABSTRACT**

The species *Lepidium meyenii* Walpers traditionally known as "maca", typical of the High Andean region of Bolivia, Perú and Chile, are widely used due to its health giving properties, qualities attributed to the complexity of its chemical components, which are the base of the present research. The study of the hexane extract of *L. meyenii* provided a yield of 2.35% and treatment with methanol of the hexane fraction resulted in a final yield of 0.45%. This was subject to chromatography in order to characterize and identify the presence of alkaloids and Alcamides, which are characteristic of the Brassicaceae family. For the chromatographic fractionation, various techniques were used: silica gel columns (40-63 microns), and preparative plates LH-20. For identification of the isolated fraction, called G-2, instrumental methods such as NMR-C13, H1 NMR, NMR-DEP, COSY, HMBC, HMQC, MS, IR and Elemental Analysis were used. The determined chemical structure of the compound, up to date not isolated, had not been identified previously in any natural source, and to the best of our knowledge this is the first time it is described in *L. meyenii*.

**Key Words:** *L. meyenii* new compound

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha venido desarrollando en el mundo científico un gran interés hacia la caracterización estructural de componentes químicos presentes en distintas especies vegetales, constituyéndose así, la búsqueda de nuevos principios activos que sirvan como cabeza de serie para el diseño de nuevos fármacos, conjuntamente con el intento de disponer de medicamentos que no causen tantas reacciones adversas como los de síntesis.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su "Estrategia sobre Medicina Tradicional 2002-2005", definió la necesidad de aumentar la base de evidencia para la Medicina Tradicional/Medicina Complementaria y Alternativa (MT/MCA), haciendo énfasis en el aislamiento y caracterización química de los componentes de las especies que se emplean de manera popular y ancestral.<sup>1,2,3,4</sup>

*L. meyenii*, es seleccionada por destacar una mayor complejidad respecto a sus componentes químicos en el hipocotilo, además de ser una de las especies típicas de Latinoamérica que es fuente de estudios farmacológicos de gran trascendencia.<sup>5,6</sup>

**Descripción botánica de la especie.** Popularmente esta especie es conocida como: Maca, Ginseng maca, maino, huto-huto, maha, macamaca, ayak y chichita. Denominaciones en quechua, que hacen referencia a la especie y la región geográfica donde se recolecta. Se identifican 4 variedades (ecotipos) clasificadas por el color que presenta la raíz, dicha coloración se debe a la presencia de antocianinas.<sup>7</sup> Taxonómicamente, es una representante de la familia Brassicaceae cultivada en el altiplano, determinada como *Lepidium meyenii* Walpers.<sup>8-18</sup>

**Estudio fitoquímico.** Se han identificado compuestos terpénicos, esterólics, como el beta sitosterol; estigmasterol, 3,5-estigmastadieno, brassicasterol, ergostadienol, campesterol y 3-hidroxi-5-ergostenol; 3,5-estigmastadien-7-ona<sup>19,20,21</sup>; en el aceite esencial se identificaron 53 componentes, los mayoritarios fenilacetosulfinos en un 85.9%; benzaldehidos 3.1% y derivados del acetosulfinilo 2.1%; lípidos, ácidos grasos, ácidos oleico, linoléico, linolénico, palmítico, esteárico y otros<sup>22</sup>; azúcares como la glucosa<sup>23</sup>, flavonoides<sup>24, 25</sup>; glucosinolatos glucotropeolina, n-metoxibencilglucosinato, bencilisotiocianato, p-metoxibencilisotiocianato, isotiocianatos, bencilglucosinolatos, p-metoxibencilglucosinolatos y carbolinas como el ácido (1R, 3S)-1-metil-3-(4-hidroxi-3-metilimidazol-2-yl)propanoico; alcaloides imidazólicos en el extracto lipídico, clorhidrato de 1,3-dibencil-4,5-dimetilimidazol, clorhidrato de 1,3-dibencil-2,4,5-trimetilimidazol; y por último uno denominado macaridina; alcaloides, macaridinas, macaenos y macaridina<sup>26-29</sup>, otros compuestos como proteínas, fibras, aminoácidos,

minerales, uridina, piridina, macaridina, lepidimoide, benzoatos y azúcares entre otros<sup>30-35</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

**Recolección de la droga.** La especie fue recolectada de la región alto andina de la Ciudad de La Paz, Provincia Murillo de Bolivia. El pulverizado del hipocotilo de la especie, fue proporcionado por los Laboratorios NATURALCOS (Industria Farmacéutica), de la Ciudad de La Paz, con número de herbario: 2214. Previo a este paso, se desecó y se pulverizó el material vegetal, con el fin de estabilizarlo.

**Obtención del extracto.** Se utilizó el sistema Soxhlet, empleando hexano (Panreac ®) como solvente de extracción; hasta el agotamiento de la droga. Al extracto hexánico (residuo) se resuspendió en metanol (Panreac ®) a 4 °C tras 24 horas; se filtró el sobrenadante metanólico y se concentró con ayuda de un rotavapor a presión reducida.

**Técnica.** La técnica principal utilizada ha sido la cromatografía en sus diferentes modalidades.

**CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.** Se empleó como fase estacionaria placas cromatográficas de sílicagel fluorescentes (60 F254 Merck ®) y fase móvil: Hexano. (Panreac ®) y grado HPLC (LAB-SCAN), acetato de etilo. (Panreac ®), cloroformo. (Panreac ®), diclorometano. (Panreac ®) y grado HPLC (LAB-SCAN), metanol. (Panreac ®), butanol. (Panreac®), acetona. (Panreac®), tetra hidroxil furano. (Panreac®) y como reveladores: Rodamina (reactivo). (Fluka Chemika), fluoresceína (Fluka Chemika), anisaldehido sulfúrico. (BDH Chemicals Ltd.), cloruro férrico (reactivo). (Panreac).<sup>36-39</sup>

**CROMATOGRAFIA EN COLUMNA, CON SOPORTE DE SILICAGEL.** El fraccionamiento cromatográfico progresivo del extracto metanólico de la fracción hexánica, se realizó siguiendo las técnicas de cromatografía en columna. La muestra se disolvió en la menor cantidad de eluyente, introduciendo los 45 g de extracto metanólico suspendido en (hexano al 100%).<sup>40,41</sup>

**CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA, SEPHADEX LH-20.** Las fracciones más representativas siguieron el fraccionamiento por este método.

**ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y ANALISIS ELEMENTAL.** Ambos fueron realizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en la unidad dependiente del C.A.I. (Centro de Apoyo a la Investigación) utilizando el espectrómetro infrarrojo Perkin Elmer Paragon 1000 FT-IR spectrophotometer. Las condiciones de ensayo fueron: X: 16 scans, 4.0 cm<sup>-1</sup> y un equipo Leco 932 CHNS Combustión Microanalyzer respectivamente.

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA

MAGNÉTICA NUCLEAR. Se realizó en el (Centro de Apoyo a la Investigación) de la Universidad Complutense de Madrid, usando un Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Broker AVANCE AV-500 (500 MHz), disolviendo la muestra en cloroformo deuterado (SDS ®). Así también se utilizaron sus variantes de la misma técnica, RMN-C<sup>13</sup>, RMN-H<sup>1</sup>, RMN-DEPT, HMBC, HMQC y COSY.

ESPECTROSCOPIA DE MASAS. Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Servicio Interdepartamental de Investigación (Sidi) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. El tipo de análisis es Electrospray por el método TOFMS-Ion Spray y el equipo usado QSTAR pulsar (Applied Biosystems), con analizador QTOF.

El análisis de impacto electrónico utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectro de masas

con analizador de tiempo de vuelo (GCTOF), casa comercial Waters. El análisis mediante la técnica de electrospray utilizó un espectro de masas con analizador híbrido (QTOF) modelo QSTAR pulsar i, de la casa comercial Applied Biosystems.

## RESULTADOS

**Obtención de los extractos: hexánico, etanólico y acuoso de la especie *L. Meyenii*.** Se partió de 10g de droga pulverizada para cada uno de los solventes. La extracción hexánica proporcionó 0,23 g de residuo; la extracción etanólica 0,14 g y por último el extracto acuoso 0,042 g de residuo.

**Tabla 1. Rendimiento de los extractos de *L. meyenii*, en diferentes disolventes expresados en gramos y porcentaje**

Extracto	Rendimiento en (g)	Rendimiento en (%)
Hexánico	0,23	2,3
Etanólico	0,14	1,4
Acuoso	0,042	0,42

**Obtención de los extractos: hexánico total y metanólico del hexánico.** Se partió de 10.000g de droga pulverizada. La extracción hexánica proporcionó 235g de residuo; posteriormente, la extracción metanólica de este residuo proporcionó 45g de residuo. El rendimiento

metanólico del residuo hexánico fue menor en comparación al rendimiento hexánico.

El rendimiento del extracto hexánico fue de 2.35%, mientras que el metanólico fue de 0.45%, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Rendimiento de las extracciones hexánica y metanólica de la especie *Lepidium meyenii*, expresada en gramos y porcentaje**

Extracto	Rendimiento en (g)	Rendimiento en (%)
Hexánico	235	2,35
Metanólico del hexano	45	0,45

**Fraccionamiento del extracto metanólico y obtención del principio activo.** El fraccionamiento se realizó en una columna de vidrio, rellena de sílice 40-63µm como adsorbente y la fase móvil hexano/acetato de etilo en gradiente de concentración, partiendo de menor polaridad hacia mayor polaridad con ayuda del acetato de etilo. El seguimiento del fraccionamiento cromatográfico se realizó por cromatografía en capa fina. Las fracciones obtenidas suman un número de 164 y se reunieron en 16 fracciones totales en función a su similitud en complejidad.

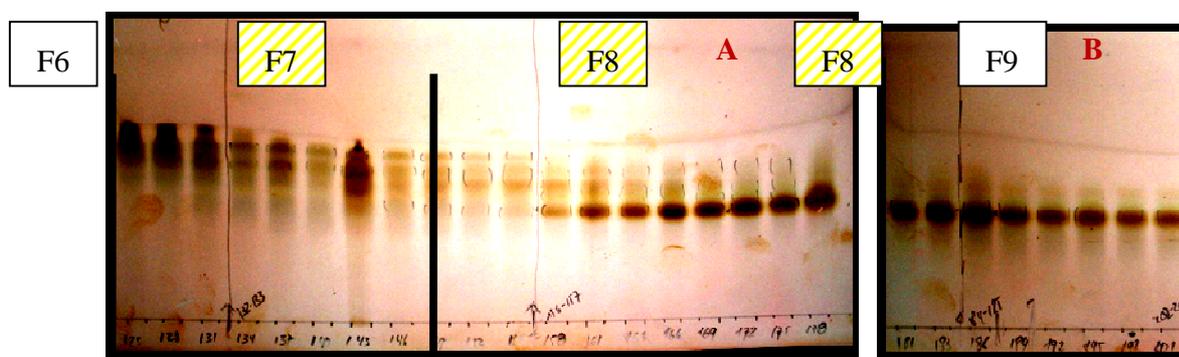
**Cromatografía en columna sephadex lh-20.** Para el desarrollo se utilizó la fracción F8, en función a la literatura empleada que destaca que es la fracción intermedia es donde se halla con mayor probabilidad la presencia de alcaloides y alcaloides. Los resultados obtenidos tras el fraccionamiento en columna de sephadex LH-20 con metanol como fase móvil, de la fracción F8 activa (3.83 g), originó 150 fracciones reunidas tras el ensayo cromatográfico en capa fina en cinco fracciones:

**Tabla 3. Rendimiento en mg y porcentaje, de las fracciones obtenidas tras el desarrollo cromatográfico en columna LH-20, de la fracción F8 activa.**

Fracción	Rendimiento (mg)	Rendimiento (%)
1V	164.6 mg	4,2 %
2O	821.1 mg	21,4 %
3P	1004.2 mg	26,2 %
4T	1541.8 mg	40,2 %
5L	67.4 mg	1,7%

**Fraccionamiento en columna de sílicagel de la fracción pt.** El desarrollo cromatográfico se realizó en columna de sílicagel 40-63 $\mu$ m, empleando como fase móvil hexano/acetato de etilo/butanol 8:1:1.

El fraccionamiento originó 350 fracciones, que fueron desarrolladas en placas cromatográficas con la siguiente fase móvil: hexano/acetato de etilo/butanol 8.5:0.75:0.75; y revelado con anisaldehído sulfúrico. Posteriormente se procedió a reunir las fracciones en función a su complejidad cromatográfica, originando 16 nuevas fracciones, destacando de todas ellas la fracción F7 $\Delta$ , con un rendimiento de 483.2 mg.



**Figura 1. Placas A y B, Fracciones que originan F7 $\Delta$  y F8 $\Delta$ , activas frente al VIH, también se muestran F6 $\Delta$  y F9 $\Delta$ , fracciones vecinas de 7 y 8. La fase móvil fue hexano/acetato de etilo/butanol 8.5:0.75:0.75; y el revelador anisaldehído sulfúrico.**

**Fraccionamiento en columna de sílicagel de la fracción F7  $\Delta$ .** Una vez identificada a la fracción más representativa, F7 $\Delta$ , se prosiguió a realizar un fraccionamiento en columna de sílicagel 40-63 $\mu$ m, utilizando hexano/acetato de etilo, en gradiente de concentración como fase móvil.

Tras el fraccionamiento de la F7 $\Delta$ , se consiguieron 250 fracciones, que se reúnen en función a su complejidad originando 7 fracciones denominadas F7 $\Delta$ a-g. Destaca la fracción F7 $\Delta$ b, por presentar menor complejidad y tener el mayor rendimiento para su posterior purificación.

**Tabla 4. Fracciones obtenidas y su rendimiento en mg del fraccionamiento en columna de sílice de la fracción F7 $\Delta$  activa frente al VIH.**

Fracción	Rendimiento en (mg)	Rendimiento en (%)
F $\Delta$ 7a	26.8 mg	5.5 %
F $\Delta$ 7b	244.7 mg	50.6 %
F $\Delta$ 7c	104.9 mg	21.7 %
F $\Delta$ 7d	11.4 mg	2.3 %
F $\Delta$ 7e	23.1 mg	4.7 %
F $\Delta$ 7f	10.0 mg	2.0 %
F $\Delta$ 7g	18.0 mg	3.7 %

**Fraccionamiento cromatográfico y purificación en placas de preparativa de la fracción G.** Una vez desarrollada toda la fracción F7Δb por la metodología preparativa, se separaron los dos componentes mayoritarios denominados G-1 que se halló con impurezas y G-2 que se encontró totalmente purificada. Los rendimientos fueron de: 11.6 mg y 40.1 mg respectivamente.

#### ESPECTRO RMN-C<sup>13</sup> DE G-2.

RMN-C<sup>13</sup>: (77.18, 77.43, 77.69 ppm, diclorometano); 27.20, 27.24, 45.48 y 48.88 ppm CH<sub>2</sub>; 65.48 ppm CH; 128.26, 128.92 y 129.09 ppm CH aromáticos; 136.3 ppm carbono cuaternario aromático; 173.92 ppm grupo carbonilo y por último 187.25 ppm tiocarbonilo.

#### ESPECTRO RMN-H<sup>1</sup> DE G-2.

RMN-H<sup>1</sup>: 1.52-1.64 ppm (m,1H), 2.05-2.2 ppm (m,1H) 2.2-2.4 ppm (m,2H), 3.5-3.7 (ddd,1H), 3.9-4.1 ppm (m,1H), 4.2-4.4 ppm (dd,1H); 4.9-5.05 ppm (d, 1H), 5.05-5.62 ppm (d,1H); 7.2-7.4 ppm (m,3H) y 7.4-7.6 ppm (m,2H).

#### ESPECTRO DEPT DE G-2.

RMN-C<sup>13</sup> DEPT: 27.21, 27.24, 45.48 y 48.86 ppm CH<sub>2</sub>; 85.48 ppm CH; y por ultimo 128.26, 128.92 y 129.09 CH aromáticos,.

**ESPECTRO HMBC DE G-2.** El resultado del espectro HMBC, correlaciono los espectros de carbono RMN-C<sup>13</sup> y el espectro de RMN-H<sup>1</sup>.

**ESPECTRO HMQC DE G-2.** El resultado del espectro HMQC, correlaciono los espectros de RMN-C<sup>13</sup>, con el espectro de RMN-H<sup>1</sup>.

**ESPECTRO H,H-COSY DE G-2.** Los resultados

correlacionan los espectros RMN-H<sup>1</sup> y RMN-H<sup>1</sup>.

**ESPECTRO DE MASAS (EM) DE G-2.** En el análisis de impacto electrónico, el espectro de masas se detectó un posible ion molecular a m/z de 246. El espectro obtenido con la técnica de electrospray confirmó lo observado en el impacto electrónico, presentando picos a m/z 247 y 269 correspondientes a iones de tipo M+H y M+Na.

**ESPECTRO INFRARROJO (IR) DE G-2.** El análisis Infrarrojo reveló la presencia de una señal similar al grupo carbonilo de una lactona.

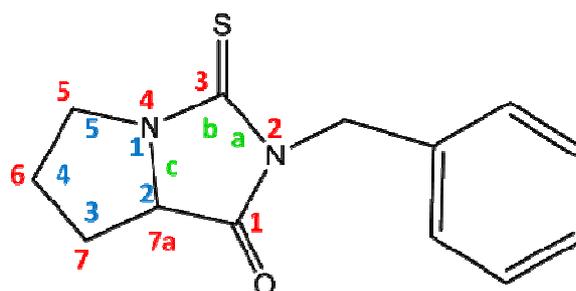
**ANALISIS ELEMENTAL DE G-2.** Por último el análisis elemental detalla la fórmula química C=13, H=14, N=2, O=1 y S=1.

#### DISCUSIÓN

Tras el uso de técnicas cromatográficas adecuadas, se fraccionó secuencialmente el extracto más activo, logrando aislar un compuesto purificado al que se denominó (G-2), así mismo tras el empleo de técnicas espectroscópicas, se identificó estructuralmente al principio activo como 2-bencil-3-tioxo-hexahidropirrólo [2,1-c]-1-ona imidazol (figura 1).

Es de destacar que la molécula aislada en la especie, no fué descrita a la fecha en ninguna fuente de origen natural.

Se encontró referencia sobre la misma molécula obtenida por síntesis química, en la que enfocaron estudios sobre patologías que involucran al sistema nervioso central.<sup>42</sup>



2-bencil-3-tioxohexahidro-1H-pirrólo [2,1-c] imidazol-1-ona. (G-2)

**Figura 2.** Estructura molecular de la compuesto G-2 y el nombre químico, 2-bencil-3-tioxohexahidropirrólo [2,1-c] imidazol-1-ona. (G-2)

#### AGRADECIMIENTOS.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID); a la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, España; a

Laboratorios e Industria Naturalcos S.A. Bolivia; al Instituto Carlos Tercero de Madrid, España; al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Farmacia de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz Bolivia.

## REFERENCIAS

1. Suzuki N. Complementary and alternative medicine: a Japanese perspective CAM. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2004; 1:113-118.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional. Ginebra: OMS; 2002. www.who.int/en/
3. Cabieses F. A favor y en contra del uso de las plantas medicinales. En: Lozoya X. 5 Simposio Internacional de Fitofármacos: Los Fitofármacos en la Clínica Moderna. México D.F: IMSS-Farmassa Schwabe; 2001. p. 5-13.
4. Canales M, Aguilar J, Prada A, Marcelo A, Huamán C, Carbajal L. Nutritional evaluation of *Lepidium meyenii* (MACA) in albino mice and their descendants. Arch. Latinoam. Nutr. 2000; 50:126-133.
5. Alzamora L, Colona E, Acero N, Galan A, Muñoz D, Linares F, Dominguez M. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium Peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. Rev. Peru. Biol. 2007; (A) 13: 219-221.
6. Alzamora L, Galván P, Álvarez E, Torres D, Colona E, Aliaga M, Marcelo A. Producción de INF en cultivos de linfocitos humanos por efecto de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (*Brassicaceae*). Rev. Peru. Biol. 2007; (B)13: 22-32.
7. Marin M. Histología de la Maca, *Lepidium meyenii* Walpers (*Brassicaceae*). Rev. Peru. biol. 2004; 10:101-108.
8. Balick M, Lee R. Maca: from traditional food crop to energy and libido stimulant. Altern. Med. 8:96-98. 2002.
9. Brako L. and Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperm of Peru. Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden 1993; 45:I-IX: 1286.
10. Brinckmann J, Smith E. Maca culture of the Junín Plateau. J. Altern. Complement. Med. 2004; 10:426-430.
11. Cárdenas M, Manual de plantas económicas de Bolivia. 2ª ed. Cochabamba: Los amigos del libro; 1989.
12. Castroviejo S, Aedo C, Gomez C, Lainz M, Montserrat P, Morales R, Muñoz F, Nieto G, Rico E, Talavera S, Viller L. Flora Ibérica, Plantas vasculares de la península Iberica e Islas Baleares. Vol. 6 Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid 311, 312, 335. 1996.
13. Chacón G. La maca (*Lepidium peruvianum*) Chacón sp. y su habitat. Rev. Peru. Biol. 1990; 3:171-272.
14. De Lucca M, Zalles A. Enciclopedia Boliviana flora medicinal boliviana Diccionario enciclopédico. 1ª ed. La Paz: Los amigos del libro; 1992.
15. Del Castillo L. Análisis y alternativas. Diversidad biológica y Biopiratería: el caso de la Maca. Debate. Orgánico. 37:23-38. 2004.
16. Girault L. Kallaway. 1ª ed. La Paz: UNICEF-OPS-OMS Quipus; 1987.
17. Monsalve C, Cano A. La familia Brassicaceae en la provincia de Huaylas, Áncash. Rev. Peru. Biol. 2003; 10:20-32.
18. Obregón L. Maca, planta medicinal y nutritiva. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima; 1998.
19. Comas M, Miquel X, Arias G, de la Torre M. Estudio bromatológico de la Maca o Paca (*Lepidium meyenii*). Alimentaria. 1996; 257:85-90.
20. Dini A, Migliuolo G, Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. Food. Chem. 1994; 49:347-349.
21. Dini I, Tenore G, Dini A. Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). Biochem. Syst. Ecol. 2002; 30:1087-1090.
22. Tellez M, Khan I, Kobaisy M, Schrader K, Dayan F, Osbrink W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp). Phytochemistry. 2002; 61:149-155.
23. 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; 25:5621-5625.
24. Gonzales G, Miranda S, Nieto J, Fernández G, Yucra S, Rubio J, Yi P, Gasco M. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. Reprod. Biol. Endocrinol. 2005; (A) 20:3.
25. Gonzales G, Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M. Dose-Response effects of *Lepidium meyenii* (Maca), aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. J. Ethnopharmacol. 2005; (B) 98:143-147.
26. McCollom M, Villinski J, McPhail K, Craker L, Gafner S. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. Phytochem. Anal. 2005; 16:463-469.
27. Zhao J, Muhammad I, Dunbar D, Mustafa J, Khan I. New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*). J. Agric Food Chem. 2005; 53:690-693.
28. Ganzera M, Zhao J, Muhammad I, Khan I. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. Chem. Pharm. Bull. 2002; 50:988-991.
29. Monsalve C, Cano A. La familia Brassicaceae en la provincia de Huaylas, Áncash. Rev. Peru. Biol. 2003; 10:20-32.
30. Bruneton J. Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales. 2º ed. Zaragoza: ACRIBIA S.A.; 2001.
31. Cui B, Zheng B, He K, Zheng Q. Imidazole Alkaloids from *Lepidium meyenii*. J. Nat. Prod. 2003; 66:1101-1103.
32. Font Quer Pio. Plantas medicinales. 2ª ed. Barcelona: Península; 1999.
33. Greger H. Alkamides: structural relationship, distribution and biological activity. Planta Med. 1984; 50:366-375.
34. León J. The "maca" (*Lepidium meyenii*), a Little-known food plant of Peru. Econ. Bot. 1964; 18:122-127.
35. Molina J, Garcia A. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. Avance y perspectiva. 2001; 20:377-387.

36. Hostettmann K, Marston A, Hostettman M. Preparative Chromatography Techniques. 1<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 1998.
37. Mohn T, Cutting B, Ernst B, Hamburger M. Extraction and analysis of intact glucosinolates--a validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography-mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. *J. Chromatogr.* 2007; (A) 28:142-151.
38. Wagner H, Zgainski E. Plant drug analysis. 1<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer Verlag; 1984.
39. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis. 2<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer Verlag; 1996.
40. Pharmacy fine Chemicals illustrated by in theory and practice. Gel filtration. Sweden; 1979.
41. Pharmacy fine Chemicals. Sephadex ion exchangers. A guide to ion exchange chromatography. Sweden; 1973.
42. Sundaram G, Venkatesh H, Ila H, Junjappa H. 1-(Methyldithiocarbonyl) imidazole as thiocarbonyl transfer reagent: A facile one-pot three-component synthesis of 3,5-and 1,3,5-substituted-2-thiohydantoins. *Letter.* 2007; 2: 251-4.