REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

"EVALUACION PRELIMINAR DE LA FARMACOCINÉTICA *in vitro* DE LA N-BENZILHEXADECANAMIDA DEL *Lepidium meyenii* (MACA) EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA B35"

Tesis presentada por la Bachiller:

AMPUERO MÁRQUEZ, DIANA CAROLINA

Para optar el Título Profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: José Villanueva Salas, PhD.

Arequipa-Perú
2016

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

RESUMEN

El principal objetivo del presente trabajo de investigación fue establecer un método para determinar la Farmacocinética *in vitro* de la N-bencilhexadecanamida, una macamida importante de *Lepidium meyenii* (MACA), en células Neuroblastoma B35.

Las células de **N**euroblastoma B35 se cultivaron a una temperatura 37°C en Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina-estreptomicina (100 mg/mL-100 mg/mL) en una atmósfera humidificada y con 5% de CO_2 dentro de una Incubadora.

El crecimiento fue confluente entre un 80-100%, luego las células fueron resembradas cada 3 días con tripsina que contenía EDTA (Ácido etildiaminotetracético). Luego, fueron puestas en placas de 6 pozos donde se dejó crecer 3 días más.

El estudio farmacocinético se realizó mediante la adición de 250 µL de un stock de macamida a las células con medio DMEM, para tener una concentración final dentro de cada pozo de 10 µM y un volumen final de 5ml. Las células y el medio se

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

extrajeron a los tiempos de muestreo (1, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 horas).

Después de removido el medio del pozo, las células se enjuagaron con DMEM sin FBS y se desechó este enjuague, después las células se rasparon y se extrajeron con metanol. LC-MS/MS (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry) fue utilizado para analizar el supernadante de las células sometidas a ultrasonido y centrifugadas.

Para el análisis de la Macamida se utilizaron 5 µL de las muestras y de las soluciones estándar de N-bencilhexadecanamida (1-20µM) que se mezclaron con un estándar interno, el cual fue N-benciltetradecanamida, y se procesaron con el sistema API 3000 LC-MS/MS. Éste sistema permitió la cuantificación de la concentración de la N-bencilhexadecanamida a partir de la detección del área bajo la curva en cada tiempo marcado para su análisis.

Se demostró con esta investigación que las células Neuroblastoma B35 absorben la N-bencilhexadecanamida, ya que con el paso de las horas aumenta la concentración dentro de las células, pero vale la pena resaltar que no se absorbió por completo.

Además, para demostrar la baja toxicidad de la macamida se realizó un ensayo de viabilidad., donde no se obtuvo diferencia significativa entre las células tratadas con N-bencilhexadecanamida y con el control.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ABSTRACT

The main objective of this research was determined the concentration of N-Bencylhexadecanamide, an important macamide of *Lepidium meyenii* (MACA), on **N**euroblastoma cells B35.

The Neuroblastoma cells B35 were cultured at 37°C of temperature in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin (100 mg/mL-100 mg/mL) in a humidified atmosphere and with 5% CO2 at 37 ° C.

Growth was confluent between 80-100%, and then cells were replated every 3 days with trypsin containing EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). Then they were placed in 6-well plates where they grew three days more.

The pharmacokinetic study was realized by adding 250 µL of a stock of macamide to the cells with DMEM to have a final concentration in each well of 10 mM and a final volume of 5 ml, having added the cells and DMEM medium until the final volume. All medium was removed at the sampling times (1, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 hours).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

After removed the medium from the well, cells were rinsed with DMEM without FBS and this rinse was discarded, then cells were scraped off and extracted with methanol. LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) was used to analyse the supernatant of sonicated cells and centrifugated.

For the analysis of the macamide 5 mL of sample and standard solutions of N-bencilhexadecanamida (1-20 uM) that were mixed with an internal standard, which was used N-benciltetradecanamida, and processed with the API system 3000 LC-MS/MS. This system allowed the quantification of the concentration of the N-bencilhexadecanamida from detection area under the curve in each time marked for analysis.

It was shown with the research that Neuroblastoma B35 cells absorb the N-bencilhexadecanamida, because it increases the concentration inside the cells over time, but it is worth noting that it is not completely absorbed.

To demonstrate the low toxicity of the macamde, viability assay was performed, where no significant difference was obtained between treated with N-bencilhexadecanamide and with control.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

DEDICATORIA

Primero, quiero darle gracias y dedicárselo a Dios por permitirme estar en este momento de mi vida; segundo, a mi hermano que está en el cielo ya que gracias a él he querido superarme y desde allá me ha cuidado siempre; tercero, a mis padres, que gracias a ellos soy lo que soy y por el sacrificio que hicieron, y cuarto, a mi hermana y abuelos que sin su apoyo, confianza y paciencia no lo hubiera podido lograr.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy encarecidamente a al Dr. Timothy Maher, Dr. Mark Bolhke, Dr. Alejandro Pino-Figueroa y Dr. José Villanueva Salas, por brindarme todo el apoyo necesario y conocimientos para la realización de este trabajo. Muchísimas gracias.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INDICE

RESUMEN ii

ABSTRACT iv

DEDICATORIA vi

AGRADECIMIENTOS vii

INDICE DE FIGURAS x

INDICE DE TABLAS xi

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS 3

OBJETIVOS 4

I. MARCO TEÓRICO 6

1. MACA (*Lepidium meyenii*). 6
   1.1. Descripción General. 6
   1.2. Historia. 6
   1.3. Clasificación Taxonómica. 8
   1.4. Descripción Botánica. 9
   1.5. Ecotipos Principales. 10
   1.6. Usos y Propiedades. 11
   1.7. Composición Química. 12
2. MACAMIDAS. 18
   2.1. Introducción. 18
   2.2. Listado de Macamidas. 19
3. NEUROBLASTOMA B35. 19
   3.1. Introducción. 19
   3.1. Uso del Neuroblastoma B35 20
   3.2. Componentes del Neuroblastoma B35. 21
4. FARMACOCINÉTICA. 24
   4.1. Introducción a la Farmacocinética. 24
   4.2. Etapas básicas. 25
   4.3. Parámetros Farmacocinéticos. 25
   4.4. Modelos Farmacocinéticos: 27
5. LC/MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). 28
   5.1. Introducción 28
   5.2. Usos. 29
   5.3. Elementos del LC-MS/MS. 29
   5.4. Tipos de Espectrómetro de masas. 30

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

II. MATERIALES Y METODOS.....33
1. MATERIALES.....33
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....33
1.2. MATERIALES Y REACTIVOS.....33
1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....35
2.1. OBTENCION DE N-bencilhexadecanamida.....35
2.2. CULTIVO DE CÉLULAS.....35
2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....36
2.4. LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.....37
2.5. MUESTREO DEL MEDIO.....39
2.6. MUESTREO DE CÉLULAS.....40
2.7. Análisis LC-MS/MS de la N-bencilhexadecanamida.....40
2.7.1. Preparación de las muestras.....40
2.7.2. Condiciones cromatográficas.....41
2.8. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LA N-bencilhexadecanamida.....41
2.9. ANALISIS ESTADISTICOS DE DATOS DE LA VIABILIDAD.....42
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....46
1. CULTIVO CELULAR.....46
2. ANALISIS LC-MS/MS.....47
2.1. Gráficosde las Curvas de Calibración.....49
3. Análisis de Datos de N-bencilhexadecanamida.....52
3.1. EN EL MEDIO.....52
3.2. EN LAS CÉLULAS.....53
4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE CÉLULAS.....58
CONCLUSIONES.....62
SUGERENCIAS.....63
REFERENCIAS.....65
ANEXO I. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DMEM.....72
ANEXO II. TABLA DE LAS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO.....74
ANEXO III. TABLA DE LAS CONCENTRACIONES EN LAS CÉLULAS.....75
ANEXO IV. Tabla de t-student.....76
ANEXO IV. Tabla de Fischer-Snedecor, α=0.05.....77

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

INDICE DE FIGURAS

FIGURA I.1. HIPOCÓTILOS SECOS DE *LEPIDIUM MEYENII*.[8]. 10
FIGURA I.2. GLUCOSINOLATOS DESCRITOS EN LA MACA.....16
FIGURA I.3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE MACARIDINA. [4] 16
FIGURA I.4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LEPIDILINA A (IZQUIERDA) Y LEPIDILINA B (DERECHA) *[28]* 17
FIGURA I.5. ESTRUCTURA DE 5-OXO-6E, 8E-OCTADECADIENOICO (MACAENO). [51].....18
FIGURA I.6. LA ESTRUCTURA GENERAL DE LAS MACAMIDAS. [20].....19
FIGURA I.7. NEUROBLASTOMA B35.....20
FIGURA I.8. CONTENIDO DE FARMACOCINÉTICA. [29].....24
FIGURA I.9. CINÉTICA DE ORDEN CERO. 27
FIGURA I.10. CINÉTICA DE ORDEN UNO. 28
FIGURA I.11. ELEMENTOS DE UN SISTEMA LC-MS/MS. [35].....29
FIGURA I.12. SISTEMA ESPECTRÓMETRO DE TRIPLECUADRUPOLO [38]. 31
FIGURA II.1. CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA PERFORMANCE (HP®, AGILENT 1100 HPLC) Y LC-MS/MS 3000 API (AB/SCIEX®) 34
FIGURA II.2. REACCIÓN DEL ENSAYO MTS. 42
FIGURA III.1. IMÁGENES EN MICROSCOPIO INVERTIDO DE NEUROBLASTOMA B35.....46
FIGURA III.2. LC-MS/MS CROMATOGRAMA DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN EL MEDIO.....47
FIGURA III.3. LC-MS/MS CROMATOGRAMA DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN CÉLULAS 48
FIGURA III.4. N- BENCILHEXADECANAMIDA (COMPOUND 11) 48
FIGURA III.5. N- BENCILTETRADECANAMIDA (COMPOUND 90) 49
FIGURA III.6. CURVA DE CALIBRACIÓN DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN EL MEDIO.....50
FIGURA III.7. CURVA DE CALIBRACIÓN DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN LAS CÉLULAS 51
FIGURA III.8.CONCENTRACIÓN VS. TIEMPO DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN EL MEDIO.....53
FIGURA III.9. CURVA CONCENTRACIÓN VS. TIEMPO DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN CÉLULAS. 54
FIGURA III.10. CURVA CONCENTRACIÓN-TIEMPO HASTA 12H DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN LAS CÉLULAS 55
FIGURA III.11. EFECTO DE LA N-BENCILHEXADECANAMIDA SOBRE LA VIABILIDAD DEL NEUROBLASTOMA B35 60

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

INDICE DE TABLAS

TABLA I.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *LEPIDIUM MEYENII WALP.* .8
TABLA I.2. LISTA DE ECOTIPOS DE LEPIDIUM MEYENII WALP. (MACA) ..11
TABLA I.3. COMPOSICION QUÍMICA DE *LEPIDIUM MEYENII WALP.* 13
TABLA I.4. AMINOÁCIDOS EN *LEPIDIUM MEYENII WALP.* 14
TABLA I.5. VITAMINAS EN *LEPIDIUM MEYENII WALP.* 14
TABLA I.6. MINERALES Y MICROMINERALES EN *LEPIDIUM MEYENII WALP.* 14
TABLA I.7. ESTEROLES EN *LEPIDIUM MEYENII WALP.* 17
TABLA I.8. ESTÁNDAR DE MACAMIDAS SINTETIZADAS 22
TABLA I.9. BIOQUÍMICA DE NEUROBLASTOMA B35. 21
TABLA III.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN EL MEDIO 50
TABLA III.2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN LAS CÉLULAS 51
TABLA III.3. DATOS DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN EL MEDIO 52
TABLA III.4. DATOS DE N-BENCILHEXADECANAMIDA EN LAS CÉLULAS 54
TABLA III.5. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS 57
TABLA III.6. ABSORBANCIA DE LA VIABILIDAD DE N-BENCILHEXADECANAMIDA 58
TABLA III.7. PORCENTAJE DE LA VIABILIDAD DE N-BENCILHEXADECANAMIDA 59
TABLA III.8. PRUEBA F PARA VARIANZAS DE LA VIABILIDAD DEL NEUROBLASTOMA B35. 59
TABLA III.9. PRUEBA T SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES. 60

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INTRODUCCIÓN.

Lepidium meyenii (Maca) es una planta que crece entre los 3800-4000 m.s.n.m. en los Andes del Perú, Junín, cerca de Cerro de Pasco. Viene de la familia *Brassicaceae* y del género *Lepidium.* Padre Cobo fue el primero en describir el nombre y las propiedades de la Maca en 1653 [8].

Las especies de la región andina están siendo actualmente investigadas por sus beneficios en la salud. La raíz principal es gruesa, y está formado por el hipocótilo [19]. El hipocótilo es la parte de la semilla que se engrosa para formar el tallo situado debajo de los cotiledones, tiene un diámetro de aproximadamente 8 centímetros. Maca es también un suplemento alimenticio y tiene propiedades medicinales, los nativos lo usaban para tratar la anemia, esterilidad, la tuberculosis, la fatiga; y tiene actividad antidepresiva [17, 19]. Los nativos de las tierras altas de Perú atribuyen que el uso de Maca en niños mejora su rendimiento escolar [8].

En el Perú y en otras partes del mundo se han realizado y se encuentran haciéndolo actualmente, investigaciones acerca del *Lepidium meyenii* debido a sus propiedades, donde la más importante es su efecto a nivel neuronal y en la cual se centran la mayoría de investigaciones.

La Maca contiene metabolitos que se dividen en primarios y secundarios. Entre los metabolitos primarios son los lípidos con ácidos grasos tales como ácido linoleico, palmítico y oleico entre otros. Los ácidos grasos saturados representan el 40.1% y el 52.7% los no saturados. Metabolitos secundarios contienen alcaloides, macaenes, macamidas y glucosinolatos [8].

Los macamidas tienen una estructura química formada por bencilamina vinculado a un ácido graso por una unión amida. Los ácidos grasos pueden tener entre 12-24 átomos de carbono, con insaturación configuración cis o trans. Algunos macamidas tienen un grupo metoxi en el anillo bencénico en la posición meta. Ejemplos de macamidas son: N-bencilhexadecanamida, N-benciloctanamida, N-bencil-16-

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

hidroxi-9-oxo-10E, 12E, 14E-octadecatrieneamida N-bencil-9, 16-dioxo-10E, 12E, 14E- octadeca-trieneamida. El porcentaje total de macamidas en el hipocótilo son varía desde 0.15% a 0.84% [19].

Existen muy pocos trabajos sobre las Macamidas, y este trabajo trata de centrarse en una de ellas, pero más que todo en el tiempo en que puede absorberse en el organismo. El presente estudio se realizó para llevar a cabo la evaluación preliminar de la farmacocinética de la N-benzylhexadecanamida, ya que este compuesto posee una de las mayores cantidades en porcentajes respecto a la baja cantidad de macamidas que existe dentro de la Maca [19]. Además este estudio tiene mucha importancia debido a que gracias a los datos obtenidos podemos ver que es útil como método para realizar otros experimentos como ver su mecanismo de acción así como su ingesta oral en humanos, etc.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

HIPÓTESIS.

Dado que a los metabolitos del *Lepidium meyenii* (Maca) se les atribuye propiedades farmacológicas y una de las macamidas con mayor concentración es N-bencilhexadecanamida, se puede determinar su farmacocinética para evaluar la duración de su efecto a nivel neuronal.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

OBJETIVOS.

1. Determinar la concentración de N-bencilhexadecanamida dentro de las células Neuroblastoma B-35.
2. Determinar los parámetros farmacocinéticos de N-bencilhexadecanamida en células de Neuroblastoma B-35.
3. Cultivar y determinar la viabilidad de las células Neuroblastoma B35 frente a la N-bencilhexadecanamida.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO I

MARCOTEÓRICO

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

I. MARCO TEÓRICO

1. MACA (*Lepidium meyenii*).

1.1. Descripción General.

El *Lepidium meyenii Walp*. comúnmente conocida como Maca, es una planta originaria del Perú, que crece entre los 3800-4200m.s.n.m. en los Andes del Perú, Junín, cerca de Cerro de Pasco y en la meseta de Bombón [2,8].Esta planta fue domesticada aproximadamente hace dos siglos en las mesetas andinas [1].

Maca es un suplemento alimenticio con un valor nutricional muy alto y tiene propiedades medicinales [8], los nativos la usan para tratar la anemia, esterilidad, la tuberculosis, la fatiga y tiene actividad antidepresiva [17,19]. Los nativos de las tierras altas de Perú atribuyeron que el uso de Maca en niños mejora su rendimiento escolar [8].

Existen metabolitos en la planta, y encontramos los metabolitos primarios que son los lípidos con ácidos grasos tales como ácido linoleico, palmítico y oleico entre otros. Los metabolitos secundarios contienen alcaloides, macaenos, macamidas, glucosinolatos y bencil isotiocianato [8]; además de algunas vitaminas.

1.2. Historia.

La Maca se remonta a épocas antiguas en las que se dice que el hombre andino domesticaba entre varias plantas la Maca, naciendo así los grupos sedentarios alrededor de los 4000 y 1200 a.C. [2, 11].

Otros autores dicen que es posible que la Maca haya sido domesticada desde el año 700 a.C. en San Blas, Junín (Óndores, Junín) y que el área de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

producción y consumo se delimito a ciertas zonas como Chinchaycocha, Mantaro y Castrovirreyna [9].

Se dice que la Maca habría sido domesticada en la época pre-Inca con la cultura Pumpush o Chinchay en la Meseta de Bombón alrededor del año 2000 a.C. por su valor nutricional [3,6].

Después de varios años, los pueblos fueron conquistados por los Incas que alimentaban a sus tropas con porciones de Maca ya que les daba vitalidad y los fortalecía, incrementaba su rendimiento físico, extenuando marchas y combates feroces [2, 11].

El Jesuita español Bernabé Cobo fue el primero en describir el nombre y las propiedades de la Maca en 1653 en su libro "Historia del Nuevo Mundo" y su observación principal sobre esta planta fue que soporta condiciones ambientales extremas cosa que otra planta no lo hace, además identificó que la Maca sólo crece en la Diócesis de Chinchaycocha, que al igual que la Dra. María Rostworowski, que realizó un análisis sobre el documento de "La visita a Chinchaycocha el año 1549", se describe que el Encomendero Juan Tello de Sotomayor solicitaba pago de tributos con Maca por un año en esas épocas [3, 9, 15].

En el Siglo XX, siendo más específicos en la década del 60 inician las publicaciones de estudios sobre la Maca en varias tesis. En el año 1961, Chacón de Popovici realiza el primer estudio preliminar sobre la Maca en la tesis "Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii Walp*." donde localizó e identificó una nueva especie a la que denominó *Lepidium peruvianum* Chacón [2]. Según Chacón, la variedad del *Lepidium meyenii* está en estado silvestre mientras la domesticada sería *Lepidium peruvianum* Chacón [3]; hoy muchos autores dudan de ese nombre, la USDA reconoce únicamente a *Lepidium meyenii*, pero actualmente sigue habiendo un debate sobre su nomenclatura y la consideran como un sinónimo [11].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Actualmente hay bastantes trabajos de investigación sobre Maca y siguen haciéndose ya que hay mucho por explorar sobre esta planta.

1.3. Clasificación Taxonómica.

Gerhard Walpers realiza la primera descripción científica de la Maca en 1843, tomo primero el nombre de *Lepidium meyenii walpers*. En 1961 se realiza la primera experiencia científica con la Maca gracias a Chacón de Popovici que la describió como una nueva especie llamándola *Lepidium peruvianum Chacón* [2, 9, 16].

La palabra Maca proviene de dos voces de la lengua chibcha: "ma", que significa origen de altura, y "ca" que significa alto; mientras que el nombre Lepidium deriva del griego lepidion, que se entiende por pequeña escama en alusión al fruto y mencionado por Dioscórides [6, 11].

La Maca proviene de la familia *Brassicaceae* que abarca 2500 especies y cerca de 350 géneros; y del género *Lepidium* que incluye alrededor de 130 especies en el mundo, solo en Perú existen 15 especies [8, 11].

La Clasificación Taxonómica del *Lepidium meyenii* se ve en la Tabla I.1:

Tabla I.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Lepidium meyenii walp.*

División:	**Fanerógamas**
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledóneas
Subclase:	Archichlamydeas
Orden:	Papaverales – Roheadales
Familia:	Brassicaceae – Crucífera
Género:	Lepidium
Especie:	*Lepidium meyenii walp.*
NombreComún:	Maca, Maca-Maca, Malno, Ayac Willku, Ginseng Peruano.

[40]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.4. Descripción Botánica.

La Maca es una planta herbácea, autógama, glabra, anual, que presenta características, las cuales son:

Raíz tuberosa, engrosada, globosa, redondeada, napiforme, de 3-5 cm de diámetro en la zona más ensanchada y 5-9 cm de longitud, de varios colores desde el amarillo claro, pasando por el rojo, al morado y negro. La raíz principal es gruesa, y está formado por el hipocótilo (Figura I.1.), que es el responsable de las propiedades farmacológicas de la planta [16]. El hipocótilo es la parte de la semilla que se engrosa para formar el tallo situado debajo de los cotiledones, es diámetro de aproximadamente 8 centímetros [19]. El tallo es reducido del que nacen varias ramas secundarias, glabras.

Hojas basales, fuertemente pecioladas, arrosetadas, pinnatísectas y bipinnatísectas, caulinares, alternas y gradualmente más pequeñas hacia el ápice, que miden entre 20-23 cm de largo y entre 2-3 cm de ancho en la parte más distal.

Las flores son axilares en grupo, con pequeñísimas espinas; la flor es pequeña, blanca, completa, hipogínea, actinomorfa; mide de 2-2.5 mm. Presenta cáliz con 4 sépalos verdes y pétalos libres que están encorvados hacia el ápice de color blanco; con 6 estambres [23].

El fruto es una silícula de 2.8-4.5 mm de longitud y de 2.5-3 mm de ancho, con una única semilla en cada celda, que es pequeña y ovoide de hasta 2 mm de largo [2, 6, 12].

La Maca presenta varios ecotipos que los veremos en la sección de ecotipos principales.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



Figura I.1. Hipocótilos secos de *Lepidium meyenii.*[8].

1.5. Ecotipos Principales.

Varios autores describen los diferentes ecotipos (Tabla I.2) de Maca, teniendo en cuenta el color externo de la raíz (hipocótilo), que puede ser blanco, amarillo, negro, rojo y morado [2, 13, 14] y se han descrito 13 ecotipos en el Departamento de Junín (Carhuamayo) [15].

Se han demostrado efectos biológicos para las diferentes variedades de la maca; así la maca negra es la que aumenta más el número y la movilidad de espermatozoides en ratas y ratones. Hay un estudio hecho en cuatro modelos experimentales diferentes en ratones, que ha demostrado que la maca negra mejora la memoria y el aprendizaje [9]. Recientemente se ha demostrado su efecto en retardar la aparición de la fatiga por el nado forzado en ratones [9].

La maca roja, se dice que revierte en ratas y ratones la hiperplasia benigna de próstata inducida por el enantato de testosterona además de la osteoporosis inducida por la ovariectomía en ratas [9, 15], y reduce significativamente el tamaño y peso de la próstata ventral en ratas [14, 15].

La maca-ecotipo amarillo, que está en un 47.8% en la región de Carhuamayo-Junín [15], estimula los macrófagos y otras células del sistema

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

inmune, por lo que se dice que tiene actividad antitumoral e inmunomoduladora (de los extractos acuoso, metanólico y alcaloides) [7], además restaura la espermatogénesis en modelos cuando esta disminuye al igual que la Maca negra que tiene más efecto en esta propiedad farmacológica [15].

Tabla I.2. Lista de Ecotipos de *Lepidium meyenii walp.* (Maca)

Color Externo de la Raíz	Porcentaje de ecotipos (%)
Amarillo	47.8
Rojo-blanco	16.5
Morado-blanco	9.0
Blanco-rojo	6.3
Plomo	5.4
Negro	4.2
Rojo-amarillo	3.7
Blanco	2.2
Blanco-morado	1.6
Amarillo-rojo	1.3
Plomo-claro	0.8
Morado-plomo	0.7
Amarillo-plomo claro	0.5

[40]

1.6. Usos y Propiedades.

Maca es usada por la región andina por su supuesta acción afrodisiaca en hombres y mujeres, además de propiedades fertilizantes [2, 4],y por tener valiosos ingredientes nutritivos y ser un buen suplemento alimenticio para el ser humano, actúan como remedio en la menopausia atenuando sus signos y síntomas [1, 7]. Fernández S. y Osorio J (2005), evaluaron en 60 pacientes menopáusicas que la maca a la dosis de 1.5 a 3g/d permitía un tratamiento eficaz en el manejo del cuadro clínico de las pacientes con climaterio [6].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Se dice también que ayuda en las deficiencias de algún órgano deteriorado, además de que se recomienda en casos de desnutrición, convalecencia, pérdida de memoria, como tónico general y geriátrico y en debilidad de cualquier origen. Por su cantidad de macro y micronutrientes se recomienda como antiartrítica y en afecciones respiratorias [2], además como revitalizante. Actualmente se le ha atribuido actividad citostática y antitumoral, antioxidante y antihipoglucemiante, etc. [4]. Los nativos usan para tratar la anemia; esterilidad, afectando los niveles séricos de testosterona, la tuberculosis, la fatiga y tiene actividad antidepresiva, leucemia y cáncer [5, 7, 17, 19]. Los nativos de las tierras altas de Perú atributo que el uso de Maca en niños mejora su rendimiento escolar [8].

López Fando y colaboradores (2004) investigaron la actividad antiestrés del *Lepidium meyenii*, y Alzamora G y col (2005) demostraron el efecto inmunomodulador y la estimulación en la producción de interferon-y (IFN-y) en cultivos de linfocitos de pacientes infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Haito Ch.K y col. observaron el efecto antiestrés de *Lepidium peruvianum* al prevenir la producción de úlceras gástricas en ratas con estrés por inmovilización [6].

Otros efectos farmacológicos a los que se le atribuye son disminuye o revierte la osteoporosis, efectos neuroprotectores, previene la hiperplasia prostática de testosterona de acuerdo a experimentos con inducción del mismo [7, 8].

1.7. Composición Química.

1.7.1. Introducción.

A partir de 1960 se empezaron los estudios sobre la Maca comprobándose su alto valor nutricional hasta la fecha [4].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La Maca contiene metabolitos que son sacados de sus hipocótilos y se dividen en primarios y secundarios [8]. Estos metabolitos son macro y micronutrientes que están en concentraciones elevadas [4].

1.7.2. Metabolitos primarios.

Entre los metabolitos primarios, que corresponden al componente nutricional, están los lípidos con ácidos grasos tales como ácido linoleico, palmítico y oleico entre otros. Los ácidos grasos saturados representan el 40.1% y el 52.7% los no saturados. Los hipocótilos secos de Maca son 13-16% de proteínas, mostradas en la Tabla 1.3; y rico en aminoácidos esenciales al contrario de los frescos, los cuales contienen 80% de agua y elevadas cantidades de hierro y calcio [1, 8].

Tabla I.3. COMPOSICION QUÍMICA DE *Lepidium meyenii walp.*

HUMEDAD	5.00 – 19.62
PROTEINAS	10.00 – 18.25
CENIZAS	3.46 – 6.43
GRASA	0.20 – 2.20
FIBRA	3.85 – 8.50
CARBOHIDRATOS	51.81 – 76.05

[2, 11, 40]

En los metabolitos primarios se encontraron 18 aminoácidos en la raíz de los cuales 7 son esenciales con altas concentraciones, comparada con otros tubérculos [4], que se muestran en la Tabla 1.4.

Se encontraron vitaminas como niacina (alta concentración) y en menor proporción tiamina, riboflavina y vitamina C; por lo que es usado como suplemento nutricional [4], y se muestran en la Tabla 1.5.

Además, se encuentra minerales abundantemente en la raíz de la Maca, con altas concentraciones de potasio, calcio y hierro; mostrados en la Tabla I.6.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla I.4. AMINOÁCIDOS EN *Lepidium meyenii walp.*

AMINOACIDOS	mg/g proteína
Alanina	63.1
Arginina	99.4
Ácido Aspártico	91.7
Ácido Glutámico	156.5
Glicina	68.3
Histidina	21.9
Hidroxiprolina	26.0
Leucina	91.0
Lisina	54.5
Metionina	28.0
Fenilalanina	55.3
Prolina	0.5
Sarcisina	0.7
Serina	50.4
Treonina	33,1
Tirosina	30.6
Valina	79.3

[2, 11, 40]

Tabla I.5. VITAMINAS EN *Lepidium meyenii walp.*

VITAMINAS	mg/100g
CAROTENO	0.07
ACIDO ASCORBICO	0.80 – 3.52
TIAMINA (B1)	0.15 – 1.17
RIBOFLANINA	0.31 – 0.76
PIRIDOXINA	1.00
NIACINA	37.27 – 43.03

[2, 11, 40]

Tabla I.6. MINERALES Y MICROMINERALES EN *Lepidium meyenii walp.*

MINERALES	mg/100g
CALCIO	150 – 650.35
FOSFORO	183 – 329
MAGNESIO	70 – 114.63
SODIO	18.70 – 40
POTASIO	1000 – 2050

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

OLIGOELEMENTOS	mg/ml
COBRE	5.90
ZINC	2.80 – 6.12
MANGANESO	0.80
HIERRO	9.93 – 24.37
SELENIO	0.27 – 0.30

[2, 11. 40]

1.7.3. Metabolitos secundarios.

En 1961, Chacón reporta por primera vez la presencia de metabolitos secundarios reportándose alcaloides, taninos, saponinas y glucósidos, además se han descrito bencilalcamidas y aceites esenciales [6, 7, 12].

Existen otros que corresponden a los componentes con propiedades biológicas y medicinales tales como macaridinas, macaenos y macamidas que solo se encuentran en esta planta [8].

1.7.3.1. Glucosinolatos:

También llamados heterósidos sulfocianogenéticos; situados en las vacuolas de la planta *Lepidium meyenii* y de otras plantas perteneciente a la familia Brassicaceae, que cuando se rompe son liberados e hidrolizados rápidamente por un conjunto de enzimas llamada mirosinasas, y hay mayor cantidad en la raíz de maca fresca que en productos procesados de maca. Se han encontraron 9 glucosinolatos (Figura I.2), donde la mayoría contienen núcleos aromáticos.

Estos compuestos parecen tener actividades preventivas en varios modelos de tumores en animales de experimentación [11]. Otros autores indican que existe hasta 17 tipos de glucosinolatos en una Brassicaceae [12].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Dependiendo de la estructura de R se han descrito los siguientes glucosinolatos:

- Glucotropaeolina
- m-Hidroxibencilglucosinolato
- p-Metoxibencilglucosinolato
- 4-Metoxiglucobrasicina
- Glucoalisina
- Glucosinalbina
- Glucolimnantina
- Glucobrasicanapina
- Glucobrasicina

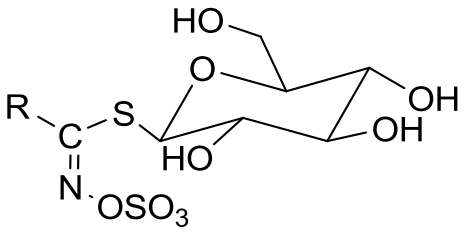


Figura I.2. Glucosinolatos descritos en la maca

Fuente: *[4]*

1.7.3.2. Alcaloides:

Se han aislado 3 alcaloides de la raíz de maca (extracto del hipocótilo) que se verán en la Figura I.3 y I.4, estos vienen a ser dos de tipo imidazólico, lepidilina A y lepidilina B; y un derivado de la dihidropiridina, llamado macaridina [4].

Los alcaloides presentes pueden contribuir a la actividad anticancerígena, propuesta hecha por algunos autores y otros proponen que los alcaloides pueden contribuir en la actividad estimulante del sistema reproductor en ratas [4].

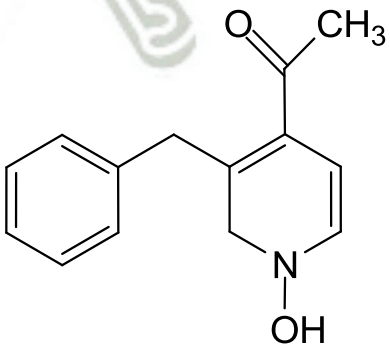


Figura I.3. Estructura química de macaridina. [4]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

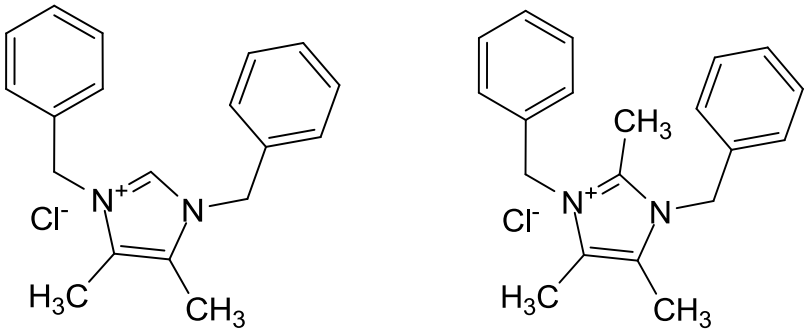


Figura I.4. Estructura química de lepidilina A (izquierda) y lepidilina B (derecha) ***[28]***

1.7.3.3. Esteroles:

Tabla I.7. ESTEROLES EN *Lepidium meyenii walp*.

Compuestos Esteroles	Porcentaje
Sitosterol	45.50%
Campesterol	27.30%
Ergosterol	13.60%
Brasicasterol	9.10%
Ergostaniedol	4.50%

[11]

1.7.3.4. Ácidos Grasos Poliinsaturados:

La Maca contiene nueve ácidos grasos poliinsaturados, donde existe dos de ellos que son los más importantes, macaenos (Figura I.5) y macamidas (Figura I.6) y son biológicamente activos.

La presencia de ellos en todas las variedades en el mercado está entre 0.15% de macaenos y 0.84% de macamidas con el resultado de ello el consumo oscila entre 1-52 y 14.88 mg/día, respectivamente [7, 11].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

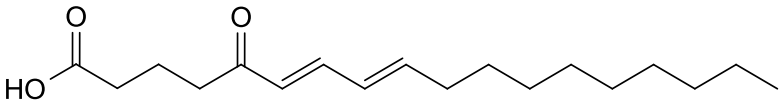


Figura I.5. Estructura de 5-oxo-6E, 8E-octadecadienoico (Macaeno). [51]

1.7.3.5. Otros:

En la Maca encontramos otros componentes en menor proporción como; flavonoides (flavonol, quercetina), antocianinas, fenilacetonitrilo, benzaldehído, compuestos fenólicos, cumarinas, taninos, saponinas, amina alifática secundaria, aminas terciarias, almidón, fructuosa, ácidos grasos y aceites naturales [13].

2. MACAMIDAS.

2.1. Introducción.

Las Macamidas son ácidos grasos poliinsaturados (Figura I.5). Llamadas también alquilamidas son derivados lipídicos presentes en los hipocótilos de maca [28]. Tienen una estructura química formada por bencilamina vinculado a un ácido graso por una unión amida. Los ácidos grasos pueden tener entre 12-24 átomos de carbono, con insaturación configuración cis o trans. Algunos macamidas tienen un grupo metoxi en el anillo bencénico en la posición meta (Figura I.5.). Ejemplos de macamidas son: N-benzylhexadecanamida, N-benzyloctanamida, N-bencil-16-hidroxi-9-oxo-10E, 12E, 14E-octadecatrieneamide, N-bencil-9, 16-dioxo-10E, 12E, 14E-octadeca-trieneamida (Tabla I.8). El porcentaje total de macamidas y macaenos en el hipocótilo son varía desde 0.15% a 0.84% [19].

El mecanismo de acción es desconocido. Todas las macamidas son N-bencilamidas [22]. Estas sustancias son extraídas por un proceso de extracción líquido-líquido con metanol y luego con n-pentano [17].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Pino-Figueroa sostiene que las macamidas podrían ser usados como indicadores de estandarización y también sus hallazgos farmacológicos podrían establecer la importancia de *Lepidium meyenii*. [16].

El presente estudio se realizó para caracterizar la farmacocinética de la N-bencilhexadecanamida porque está presente en altas concentraciones en los hipocótilos de la planta.

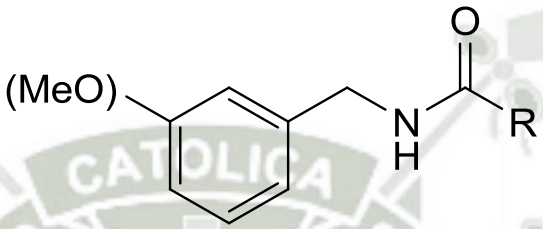


Figura I.6. La estructura general de Las Macamidas. [20]

2.2. Listado de Macamidas.

Se han reportado hasta ahora 19 macamidas, de los cuales 11 han sido sintetizados (Tabla I.8) en el laboratorio de investigación de postgrado en Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University, Boston, USA [22].

3. NEUROBLASTOMA B35.

3.1. Introducción.

Un panel de líneas de células neuronales y gliales fueron clonadas y derivadas de tumores del sistema nervioso central de una rata neonatal en 1974 por Schubert y colaboradores. Estas fueron producto de la inducción de tumoraciones en ratas neonatales BDIX con nitrosoetilurea. Una de estas líneas es usada extensamente en investigaciones es la B35 que ofrece

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

numerosas ventajas: es muy simple para crecer, se diferencia, y es útil en el análisis molecular de endocitosis y vías de señalización.

Células de Neuroblastoma B35 (Figura I.6) tienen un cariotipo enzimático casi normal y muestra propiedades neuronales tal como excitabilidad de membrana y expresión de enzimas para el metabolismo de neurotransmisores. También expresan niveles normales de enolasa neuronal específica. En cultivos, las células B35 crecen libremente unidas a placas de cultivo, probablemente debido a un bajo nivel de producción de colágeno [27].

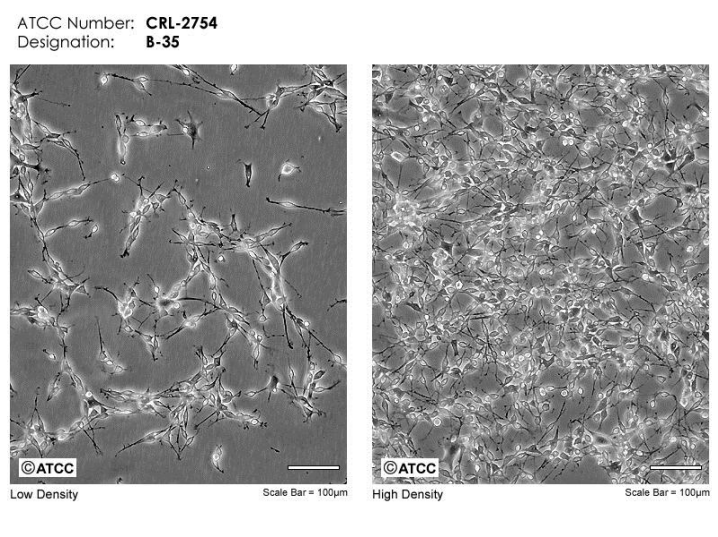


Figura I.7. Neuroblastoma B35.

Después de 2 días de desarrollo (izquierda, baja densidad), después de 4 días de desarrollo (derecha, alta densidad). [39]

3.1. Uso del Neuroblastoma B35

Esta línea celular ofrece ventajas sustanciales sobre neuronas primarias del Sistema Nervioso Central por el uso en Biología celular y experimentos bioquímicos.

Es usada particularmente en estudios de la función molecular de la adhesión de células neuronales (CAM). Una nueva proteína asociada a

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

actina llamada Palladin ha sido implicada en el crecimiento de neuritas en células B35 [27].

3.2. Componentes del Neuroblastoma B35.

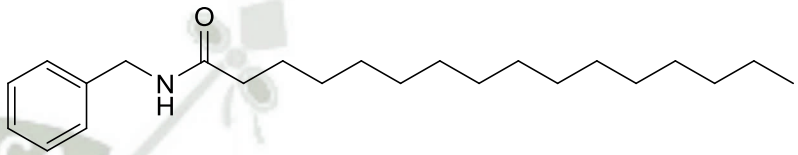
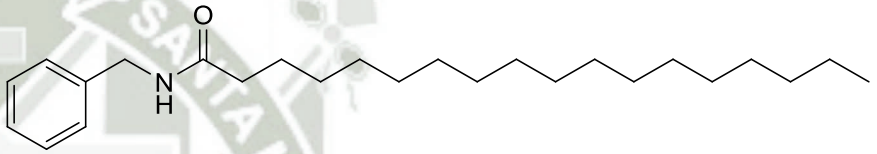
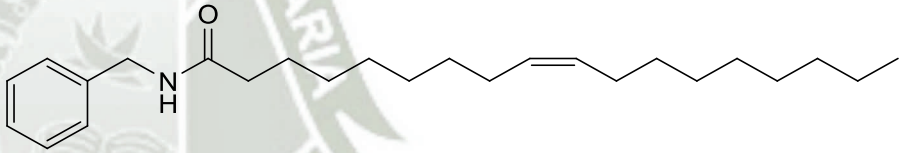
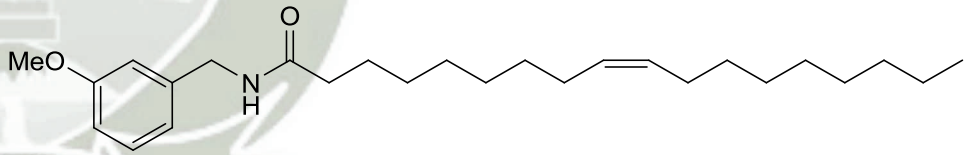
Tabla I.8. Bioquímica de Neuroblastoma B35.

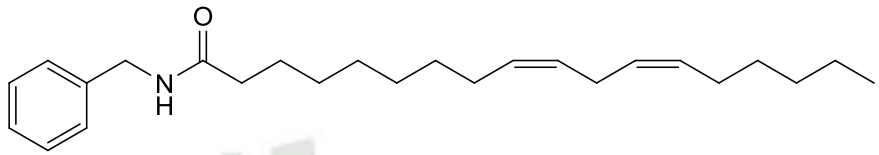
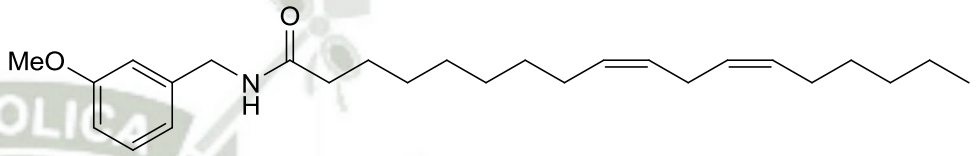
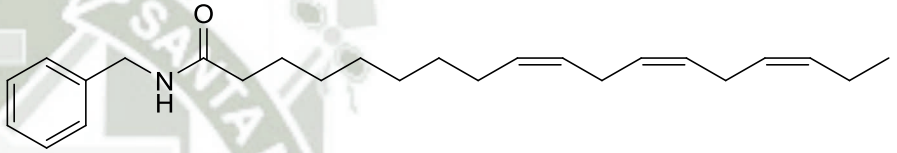
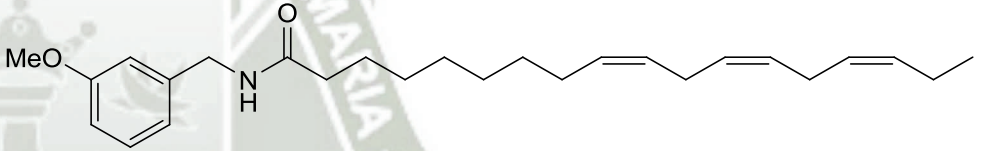
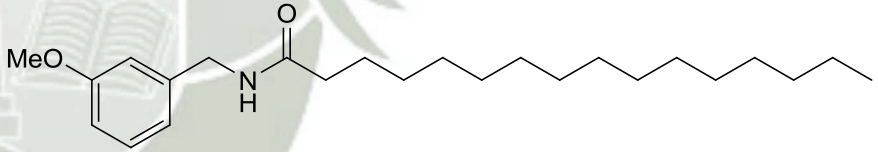
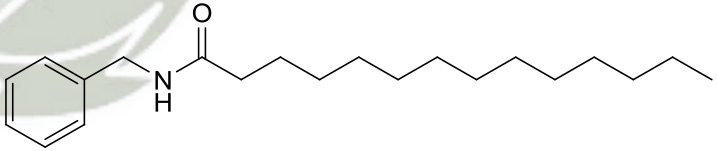
Propiedades Bioquímicas.	Descripción.
Excitabilidad de membrana	Presente
α-Neurotoxina	Sustancia que indica excitabilidad de membrana.
O-Serum	Indicador positivo: puede cambiar la morfología del Neuroblastoma.
Dibutiril AMP cíclico	Indicador positivo: puede cambiar la morfología del Neuroblastoma.
Acetil Colina (ACh)	40 pmol ($^{14}CO_2$ liberado)·min^{-1}·mg^{-1} (proteína libre)
Tirosina Hidroxilasa (TH)	<2 pmol ($^{14}CO_2$ liberado)· 20 min^{-1}·mg^{-1} (proteína libre)
Glutamato Descarboxilasa (GAD)	330 pmol ($^{14}CO_2$ liberado)· 20 min^{-1}·mg^{-1} (proteína libre)
Ácido γ-aminobutírico (GABA)	7.1 residuos · 1000 residuos de aminoácidos libres.
Acetil Colinesterasa (AChE)	100 pmol ·min^{-1}·mg^{-1} (proteína libre)
Butiril Colinesterasa (BChE)	60 pmol ·min^{-1}·mg^{-1} (proteína libre)
S100 (Proteína específica)	< 5 ng·100 ng^{-1} (proteína soluble)
14-3-2 (Proteína específica)	520 ng·100 ng^{-1} (proteína soluble)

[28]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

Tabla I.9. Estándar de Macamidas Sintetizadas

Código	Nombre	Estructura Química
11	N-bencillhexadecanamida	
12	N-benciloctadecanamida	
13	N-bencil-9Z-octadecanamida	
70	N-(3-metoxibencil)-9Z-octadecanamida	

75	N-bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida	
76	N-(3-metoxibencil)-(9Z,12Z)-octadecadienamida	
77	N-bencil-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida	
78	N-(3-metoxibencil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida	
79	N-(3-metoxibencil)-hexadecanamida	
90	N-benciltetradecanamida	

[20]

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4. FARMACOCINÉTICA.

4.1. Introducción a la Farmacocinética.

La palabra "Farmacocinética" proviene del vocablo griego que se usaba para designar medicamentos y venenos. El término "Farmacocinética" fue dado por el Profesor F. H. Dost, en 1953 en Alemania, quien la definió como "la ciencia del análisis cuantitativo entre organismo y medicamento".

El fin común de la Farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones y cantidades de medicamento y metabolitos en las muestras biológicas, tejidos y excrementos, así como su respuesta farmacológica y construir modelos acordes para interpretar los datos obtenidos (Figura I.7), es decir, el proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción [29].

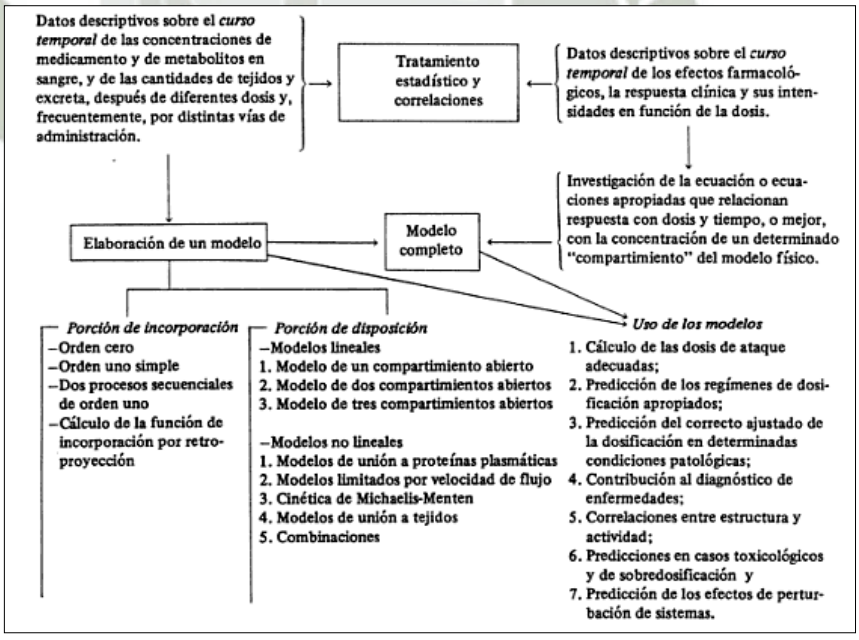


Figura I.8. Contenido de Farmacocinética. [29]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4.2. Etapas básicas.

4.2.1. Absorción:

Es el paso o transferencia de una droga desde el sitio de absorción a todos los fluidos circulantes del cuerpo [30].

4.2.2. Distribución:

Es el paso de la droga de los fluidos circulantes del cuerpo a los tejidos y órganos de este [30].

4.2.3. Metabolismo:

Es la conversión de la droga en otra forma química o metabolito comúnmente por sistemas enzimáticos endógenos como oxidación, reducción, hidrólisis, desalquilación, acetilación, sulfatación o glucuronidación [30].

4.2.4. Excreción:

Es la eliminación de la droga del cuerpo principalmente por vía urinaria y a veces vía fecal, biliar, sudor, o aire exhalado [30].

4.3. Parámetros Farmacocinéticos.

4.3.1. Volumen aparente de distribución (Vd):

Es la medida del volumen fisiológico en el cual la droga es contenida y relaciona la dosis administrada con la concentración plasmática resultante [30, 31].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$Vd = \frac{\text{DS}}{\text{Cp}}$$

Ecuación I. 1.

4.3.2. Clearance:

Es usado en Farmacocinética Clínica y se define como los mililitros de sangre o volumen depurados de la droga por unidad de tiempo [30, 31].

$$Cl = K_{cl} \, . Vd$$

Ecuación I. 2.

4.3.3. Vida media plasmática:

También llamada vida media de eliminación o vida media de absorción; se define como el tiempo necesario para eliminar o absorber el 50% del fármaco administrado en el organismo [30, 31].

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K}$$

Ecuación I.3.

4.3.4. Área bajo la curva. Concentración versus Tiempo:

Suma de trapezoides y triángulos, cuyos lados son tiempos o concentraciones, ubicados por debajo de la curva concentración vs tiempo

$$ABC\Big|_{t_n}^{t_\infty} = \frac{C_0 + C_1}{2}(t_1) + \frac{C_1 + C_2}{2}(t_2 - t_1) + \cdots = \frac{C_n}{K}$$

Ecuación I.4.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4.3.5. Biodisponibilidad:

Es la magnitud y la velocidad con la que un principio activo o droga se absorbe y entra a la circulación sanguínea para realizar el efecto farmacológico deseado [31].

4.4. Modelos Farmacocinéticos:

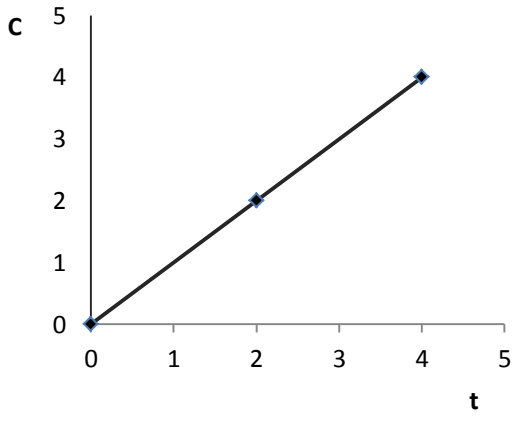
4.4.1. Parámetros modelo independientes [29]:

- Parámetros puntuales empíricos: $t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{80\%}$, etc.
- Eficiencia de disolución: EF (%).
- Tiempo medio de disolución: MDT

4.4.2. Principales Parámetros modelo dependientes:

4.4.2.1. Orden cero.

Cuando la velocidad de disolución es independiente de la cantidad de principio activo. Sigue la ecuación de línea recta.



$$y = a + bx$$

$$C_t = K.t$$

y= eje y

a=intercepto en el eje y

x=tiempo

b= la pendiente (k)

Figura I.9. Cinética de Orden Cero.

Fuente: *Elaboración propia*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.4.2.2. Orden uno.

Cuando hay dependencia de la velocidad de disolución del medio y lo retarda, además de saturación.

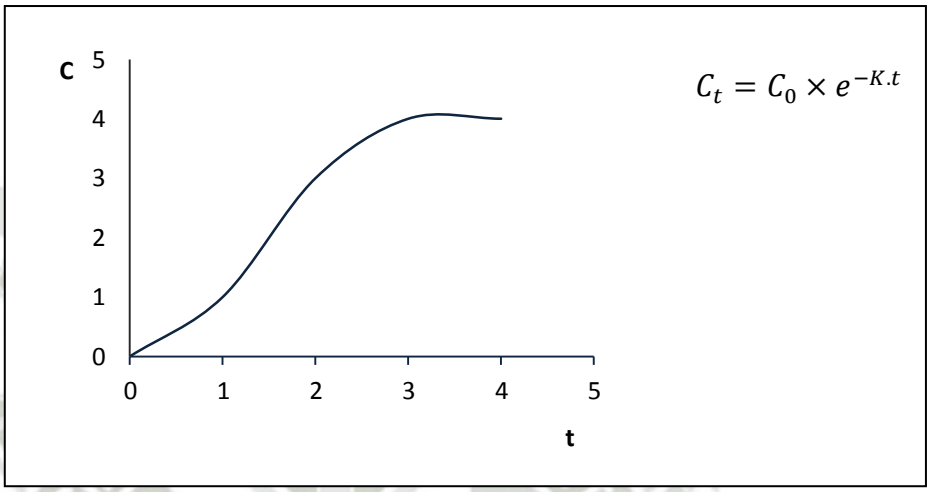


Figura I.10. Cinética de Orden Uno.

Fuente: *Elaboración propia*

5. LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

5.1. Introducción

Espectrometría de masas juega un papel muy importante en estudios de metabolismo de drogas por ser una herramienta analítica muy poderosa. En particular la Cromatografía Líquida (LC) combinado con Espectrometría de masas (MS) ha sido reconocida como el último método analítico para este tipo de investigaciones de análisis de fluidos biológicos (cuantitativo y cualitativo) debido a su especificidad y selectividad, rapidez [32, 34].

Además, la técnica de Ionización de Presión Atmosférica (API) da una excelente selectividad, por lo que da más resultados exactos y pueden ser analizados múltiples componentes simultáneamente [32].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

5.2. Usos.

Es usado en investigaciones de descubrimiento de nuevas drogas, y como parte de ello es el metabolismo de droga y pruebas de Farmacocinética (DMPK) que miden las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), al igual que los Parámetros Farmacocinéticos de las moléculas [35].

5.3. Elementos del LC-MS/MS.

Como se muestra en la Figura I.10 los elementos del sistema LC-MS están compuestos por el autocargador de muestras (*Autosampler*), HPLC, la fuente de ionización (*Ionization Source*), el Espectrómetro de Masas (*Mass spectrometer*) y el analizador de datos (*Computer*) [35].

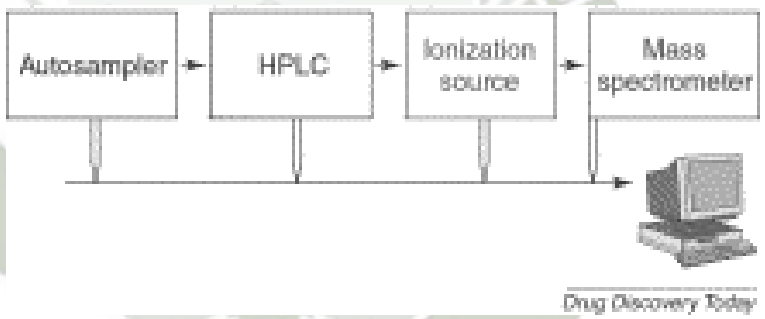


Figura I.11. Elementos de un sistema LC-MS/MS. [35]

Estos elementos sirven para todo el proceso desde el ingreso de la muestra; pasando por varias etapas, las cuales separan las moléculas de acuerdo a la relación masa-carga (m/z); hasta su proceso en el sistema de datos [36].

Existen varios tipos de fuentes de ionización que pueden ser usadas en la interface entre el HPLC y el Espectrómetro de masas. Las dos más comunes fuentes son la Ionización Electrospray (ESI) e Ionización Química a presión atmosférica (APCI) que junto a la Fotoionización a

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

presión atmosférica (APPI) son referidas a menudo como fuentes de Ionización a presión atmosférica (API) [34, 36].

5.4. Tipos de Espectrómetro de masas.

Existen varios tipos de espectrómetro de masas, los cuales cumplen la función de separar iones formados en la fuente de ionización, de acuerdo a su relación m/zen esta oportunidad mencionaremos cuatro de ellos:

- **Único Cuadrupolo (Simple Quadrupole mass spectometer).** Es el sistema más comúnmente usado y brinda un espectro de masa a cada pico cromatográfico que eluye de la columna LC y es analizado por el sistema MS.
- **Tiempo de vuelo (Time-of-flight).** Brinda una alta resolución de espectro de masas que es capaz de registrar los iones formados en una escala de tiempo de microsegundos que ofrece una sensibilidad de detección.
- **Triple Cuadrupolo (Triple Quadrupole MS-MS system).** Pasa por tres fases ($Q_1Q_2Q_3$) como se muestra en la Figura I.11. Es comúnmente usado en ensayos bioanalíticos y para ensayos de identificación de metabolitos como ensayos de Farmacocinética, debido a su amplia disponibilidad y excelentes propiedades de *Tandem mass* (MS/MS).
- **Trampa de Iones (Ion-trap mass spectometer).** Es como el Triple Cuadrupolo, pero tiene mayor sensibilidad y eficiencia en la disociación de iones precursores; es usada comúnmente como detector cromatográfico.

Se han encontrado más tipos de espectrómetro de masas, con capacidades únicas, que han ido creciendo a lo largo del tiempo; de los cuales han sido unidos dos tipos de espectrómetro de masas, siendo un

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Sistema Hibrido, como por ejemplo el Triple cuadrupolo con el tiempo de vuelo (TOF) [34, 37].

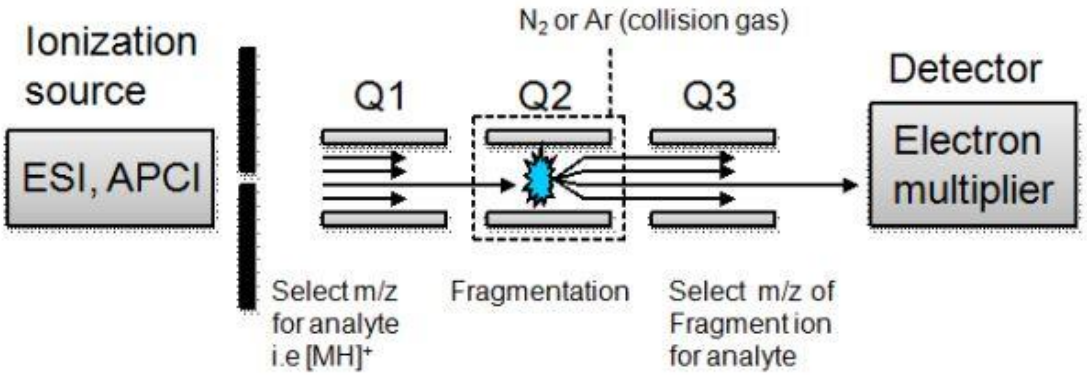


Figura I.12. Sistema espectrómetro de TripleCuadrupolo [38].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

II. MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1.1. Neuroblastoma B35.

Se utilizó las células Neuroblastoma B35 (ATCC®) de ratas, esta se halló a una temperatura de -200°C de una cámara de nitrógeno líquido en los laboratorios de investigación de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*, Boston, USA.

1.2. MATERIALES Y REACTIVOS.

1.2.1. Equipos.

- Balanza analítica (Sartorius®)
- Cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2)
- Microscopio invertido (Olympus®, CKX31)
- Centrifugadora (FisherScientific®, Marathon 16KM)
- Sonicador (FisherScientific®, 40:0.15:4C)
- Celulómetro (Nexcelum BioScience®, AutoT4)
- Cromatógrafo líquido de alta performance (Hp®, Agilent 1100 HPLC)
- LC-MS/MS 3000 API (AB/Sciex®, Foster City, CA)
- Espectofotómetro de placas

1.2.2. Equipos de laboratorio.

- Eppendorfs.
- Micropipetas.
- Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 ml.
- Tubos de centrifugación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Placas de 6 pozos (*six well plates*)
- Frascos
- Places de 96 pozos (*96-well plate*)

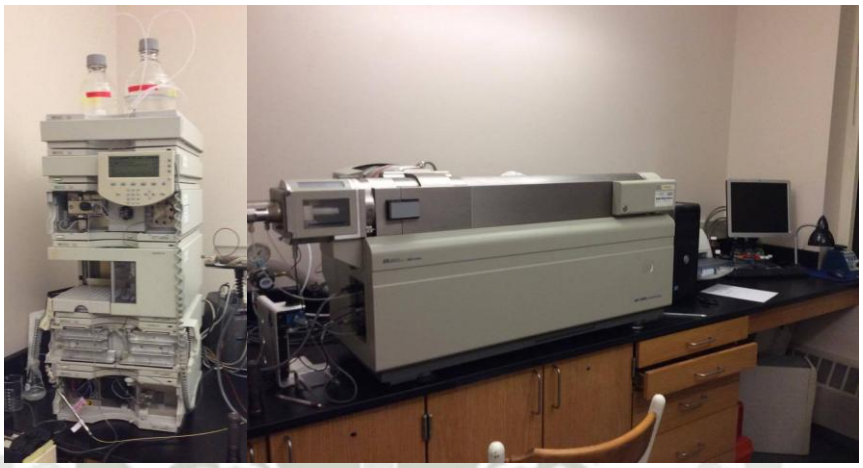


Figura III.1. Cromatógrafo líquido de alta performance (Hp®, Agilent 1100 HPLC) y LC-MS/MS 3000 API (AB/Sciex®)

1.2.3. Reactivos.

- Dimettil sulfóxido (DMSO) de Sigma Aldrich Co.®
- Solución Buffer Fosfato salino (Sigma Aldrich Co.®)
- Metanol de grado HPLC (Merck®)
- Acetonitrilo de grado HPLC (Merck®)
- Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) de ATCC®
- Tripsina-EDTA (ATCC®)
- Suero fetal de bovino (FBS) de ATCC®
- Trypan blue (Sigma Aldrich Co.®)
- MTS-assay (ATCC®)
- N-bencilhexadecanamida y N-benciltetradecanamina fueron proporcionadas por Alejandro Pino-Figueroa, PhD. Estas macamidas sintetizadas se encontraban almacenadas a -20°C en los laboratorios de investigación de postgrado en *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*, Boston, USA.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

La investigación se ejecutó en los laboratorios de postgrado en*Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University* (MCPHS University), Boston, USA.

2. MÉTODOLOGÍA.

2.1. OBTENCION DE N-bencilhexadecanamida.

La Macamida fue sintetizada y purificada en el Laboratorio de Química Medicinal en *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University* (MCPHS University), Boston, USA.

El residuo sólido es reconstituido con una solución de 10% de DMSO disuelto en solución tampón, donde los cálculos se verán más adelante.

2.2. CULTIVO DE CÉLULAS.

El proceso de cultivo celular fue elaborado en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar de presión positiva y constantemente se inhibió la proliferación microbiana con etanol al 70%.

Se optó por la línea celular Neuroblastoma B35, ésta se encontraba almacenada en una cámara de nitrógeno líquido a -200°C. Para conseguir la temperatura ambiente las células fueron colocadas en baño maría a 37°C y cuando estas alcanzaron la esta temperatura se sembraron en un frasco de incubación con medio Células de Neuroblastoma B35 en "Medio de Eagle modificado de Dulbecco" (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina-estreptomicina (100 mg/mL-100 mg/mL) y se incubaron a una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 a 37°C, este es llamado primer pasaje.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Luego, se cultivaron cada 3 días, hasta que el crecimiento fue confluente entre un 80-100%, después para la creación de nuevos pasajes se desechó el medio del primer pasaje y las células quedaron adheridas a la base del frasco por la producción de colágeno y para desprenderlas se añadió 5 mL de Tripsina-EDTA con una agitación ligera y luego se desecha, se vuelve a agregar 5 mL de Tripsina-EDTA y se pone a incubar por 12 minutos, en el que cada 3 minutos se debe hacer una agitación ligera, así se va desprendiendo la capa de células en la base y se mezcla con el medio.

Al finalizar el paso anterior se añadió 10 mL de medio DMEM sin FBS al frasco de incubación que mezclado se transfirió a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Después, se formó un pellet (precipitado de células) con sobrenadante, este último se desechó y se agregó 10 mL de medio DMEM con 10% FBS, mezclar con la micropipeta hasta que el pellet se suspenda con el medio (suspensión de células).

2.2.1. Conteo de células.

Se utilizó 20 µL de la suspensión de células y se mezclaron con la solución de 20 µL trypan blue y 20 µL de Buffer fosfato en un eppendorf para luego colocarlas en una celda para conteo y determinar el número de células viables por mL, usando un celulómetro "Nexcelom".

Una cantidad óptima de células para realizar ensayos debe ser de $1x10^6$ células/mL con una viabilidad mayor del 95%.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

La captación celular de N-bencilhexadecanamida fue realizada en los six *well plates*, usando $1x10^6$ células/pozo en el Medio con un total de 5 mL de volumen en cada pozo para las soluciones de curva de calibración, de la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

macamida en el medio y en las células. Se incubó durante 2-3 días. El día del experimento, todos los medios se sustituyeron con medio fresco sin FBS.

2.4. LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.

Soluciones estándar de N-bencilhexadecanamida de 1, 5, 10, 20 µM fueron utilizadas para preparar una curva de calibración, donde hubo 4 repeticiones que luego fueron leídas en el LC-MS/MS.

2.4.1. Para el Medio.

Se realizó cálculos a partir de un stock de 5 mM que contenía 2.7 mg de N-bencilhexadecanamida y DMSO, se obtuvo la cantidad de 1.6 ml, para luego realizar un stock de 200 µM del anterior en 10% DMSO (dimetilsulfóxido) y fueron completados hasta 1000 µL con PBS (tampón fosfato).

N-bencilhexadecanamida:

$$\frac{2.7\ \text{mg}}{345.6\ {}^{\text{mg}}/_{\text{mmol}}} = 0.00781\ \text{mmol}$$

$$\frac{0.00781\ \text{mmol}}{5\ {}^{\text{mmol}}/_{\text{L}}} = 0.0016\ \text{L} \rightarrow \quad 1.6\ \text{mL}$$

Solución: $20\ \text{X} = 200\ \mu\text{M} \rightarrow 0.2\ \text{mM}$

Pozo: $\text{X} = 10\ \mu\text{M}$

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Stock 5 mM:

$$0.001\ \text{L} \times 200 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{1\ \text{L}}{5000\ \mu\text{M}} = 0.00004\ \text{L} \rightarrow \ 0.04\ \text{mL} \rightarrow 40\ \mu\text{L}$$

$$40\ \mu\text{L de Stock 5mM} + 60\ \mu\text{L de DMSO} + \ 900\ \mu\text{M de PBS}$$

Para las diferentes concentraciones el stock de 200µM de N-bencilhexadecanamida se utilizará y será completado hasta 1000 µL con DMEM sin FBS.

20 µM:

$$0.001\ \text{L} \times 20 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{1\ \text{L}}{200\ \mu\text{mol}} = 0.0001\ \text{L} \rightarrow \ 0.1\ \text{m} \rightarrow 100\ \mu\text{L} +$$

$$900\ \mu\text{L DMEM}$$

10 µM:

$$0.01 \quad \text{L} \times 10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{1\ \text{L}}{200\ \mu\text{mol}} = 0.00005\ \text{L} \rightarrow \ 0.05\ \text{mL} \rightarrow 50\ \mu\text{L} +$$

$$950\ \mu\text{L DMEM}$$

5 µM:

$$0.01 \quad \text{L} \times 5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{1\ \text{L}}{200\ \mu\text{mol}} = 0.000025\ \text{L} \rightarrow \ 0.025\ \text{mL} \rightarrow 25\ \mu\text{L} +$$

$$975\ \mu\text{L DMEM}$$

1 µM:

$$0.01 \quad \text{L} \times 10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{1\ \text{L}}{5\ \mu\text{mol}} = 0.0002\ \text{L} \rightarrow \ 0.2\ \text{mL} \rightarrow 200\ \mu\text{L} +$$

$$800\ \mu\text{L DMEM}$$

Una vez obtenidas las muestras se llevó al LC.MS/MS para leerlas.

2.4.2. Para las Células.

Se elaboró estándares de N-bencilhexadecanamida, se utilizó un pozo del six well plate y se realizó el mismo procedimiento que el muestreo de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

células que veremos más adelante para luego raspar las células, pero sin añadir la macamida, después se utilizó el sobrenadante para realizar diferentes concentraciones: 1, 5, 10, 20 nM, con N-bencilhexadecanamida con la cantidad correcta para cada concentración.

2.5. MUESTREO DEL MEDIO.

Se añadió la cantidad necesaria de células a cada pozo del *six well plate* y de medio DMEM con FBS hasta completar 4750µL de acuerdo a los cálculos realizados, descritos en la siguiente ecuación:

$$\frac{1 \times 10^6\ cells/pozo}{2.45\ \times 10^6\ cells/mL} = 0.40816\ mL/pozo \rightarrow 408.20\ \mu L/pozo$$

$$4341.80\ \mu L\ \text{de medio} + \ 408.20\ \mu L\ \text{de cells}\ = 4750\ \mu L/pozo$$

Después de los tres días de incubación de las células, se extrajo el medio DMEM + FBS con cuidado sin dañar las células adheridas al pozo y se añadió 4750uL de DMEM sin FBS. El estudio farmacocinético se empezó realizando la adición de una concentración de 10µM de N-bencilhexadecanamida a cada pozo del *six well plate*, es decir la cantidad de 250µL del Stock 200µM a cada pozo, donde el volumen final fue de 5ml.

$$10\ \mu M \times 5\ mL\ = 200\ \mu M \times V$$

$$V = 0.25\ mL \rightarrow 250\ \mu L$$

Luego, se realizó una agitación ligera y se extrajo todo el medio en cada tiempo de muestreo (1, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 horas), sin dañar las células de nuevo, se puso en frascos rotulados con cada tiempo para luego ser almacenadas a -70 ° C hasta su análisis en el LC-MS/MS. Este procedimiento tuvo 4 repeticiones, siendo la primera repetición A en el medio, la segunda B en el medio y así sucesivamente, en diferentes días.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.6. MUESTREO DE CÉLULAS.

Después de removido el medio del pozo en el procedimiento anterior a los diferentes tiempos, las células se enjuagaron con 1000 µL de DMEM sin FBS y se descartó, luego las células se rasparon con un *cell scraper* (raspador de células) ya habiendo añadido 1,5ml de metanol de a pocos hasta dejar sin nada el pozo del *well plate* y se colocaron en un *eppendorf* de 2 mL. Además, se hizo una primera muestra como control, donde solo era el raspado de células sin macamida.

Las células se sometieron a ultrasonidos en el Sonicador (FisherScientific®) por 2 minutos y luego se centrifugaron para utilizar solo el sobrenadante y luego se almacenó a -70 ° C hasta su análisis en el LC-MS/MS. Al igual que los anteriores tuvo 4 repeticiones, y fue llamado A, B, C, D en las células.

2.7. Análisis LC-MS/MS de la N-bencilhexadecanamida.

2.7.1. Preparación de las muestras.

Las muestras almacenadas a -70° C, tanto las del medio como las de las células fueron descongeladas hasta alcanzar la temperatura ambiente. Luego, fueron diluidas 1/10 con un estándar interno llamado N-benciltetradecanamida para mayor precisión del análisis cuantitativo.

$$1/10 \rightarrow 200\ \mu L \rightarrow 180\ \mu L \text{ de muestra}$$
$$\rightarrow \ 20\ \mu L \text{ de estandar interno}$$

Después, fueron puestas en un eppendorf y homogenizadas con un agitador vórtex, que posteriormente se utilizó para el análisis cromatográfico.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.7.2. Condiciones cromatográficas.

Se utilizó cinco (5) µL de las muestras a los diferentes tiempos y las soluciones estándar de la macamida de 1-20µM, las cuales se analizaron con el sistema API 3000 LC-MS/MS (Hp®). La macamida se separó en una columna de fase reversa C-18 (100x3mm, partículas de 2.6µm, 100Å poros).

La fase móvil utilizada fue: Agua (A) y Acetonitrilo (B) 45:55 respectivamente, en el que el acetonitrilo contenía 0,1% de ácido fórmico con una velocidad de flujo de 250µL/min. Los datos fueron registrados y procesados con Analyst 1.4.2 software (AB/SCIEX).

2.8. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LA N-bencilhexadecanamida.

Se procedió con el ensayo MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), Figura II.2, para la viabilidad celular de Neuroblastoma B35.

Este ensayo contiene el compuesto derivado del tetrazolium que fue reducido por las células a un producto coloreado llamado formazan, que es cromóforo y soluble en medios de cultivo, absorbe luz a una longitud de onda de 490nm (azul). Esta conversión es acompañada por la producción de NADPH o NADH por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas [45-46].

Se incubó 2 x 10^4 células/pozo en *well plates* de 96 pozos, en medio de cultivo DMEM con FBS (10%) a 37°C y 5% de CO_2;divido en dos grupos, donde el primer grupo contenía además de las células y el medio, un vehículo que fue DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%, que se utilizó como grupo control, y el segundo grupo en vez del vehículo la droga de este

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

experimento, N-bencilhexadecanamida (10 µM);con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular.

Después de 24 horas de incubación se agregó 10 µL de solución MTS y se incubo de nuevo por 4 horas. Luego de este tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490 nm.

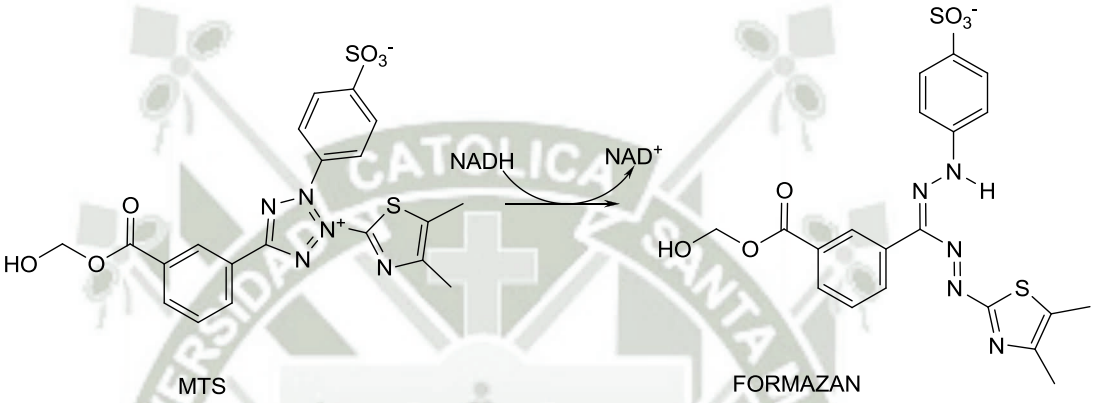


Figura II.2. Reacción del ensayo MTS.

2.9. ANALISIS ESTADISTICOS DE DATOS DE LA VIABILIDAD.

2.9.1. Test de Student.

En el presente trabajo de investigación se determinó las diferencias significativas de dos muestras, se optó por la Prueba de t de Student. Esta es una técnica estadística que se utiliza para encontrar las diferencias entre las dos medias de los grupos y para determinar el intervalo de confianza del 95% para la diferencia entre los dos medios [49]

Para hallar la "t" experimental se utiliza la siguiente ecuación:

$$t = \frac{X_e - X_c}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Donde:

t: t experimental de t de Student.

X_e: Media del grupo experimental.

X_c: Media del grupo control.

n_1: Número de muestras en grupo control

n_2: Número de muestras en grupo experimental

s: Varianza agrupada

Para poder hallar la varianza agrupada se utiliza otra ecuación:

$$s = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Donde:

s: Varianza agrupada

s_1: Desviación estándar del grupo control

s_2: Desviación estándar del grupo experimental

n_1: Número de muestras en grupo control

n_2: Número de muestras en grupo experimental

Con el test t de Student se comparan las medias y las desviaciones estándar de un grupo de datos y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo son diferencias aleatorias.

2.9.2. Distribución F de Fisher-Snedecor.

Existen dos hipótesis de la prueba t-Student: una que supone que las varianzas poblacionales son iguales y otra que no asume esto último. Para decidir si se puede suponer o no la igualdad de varianza en las dos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

poblaciones, se debe realizar antes la prueba F-Snedecor de comparación de dos varianzas [49].

Para llevar a cabo las hipótesis:

H_0: $s_1^2 = s_2^2$

H_1: $s_1^2 \neq s_2^2$

Donde:

H_0: Hipótesis nula

H_1: Hipótesis alternativa

Mediante la prueba F-Snedecor de comparación de varianzas se construye el estadístico de contraste experimental F dado por:

$$F = \frac{s_1^2, s_2^2}{s_2^2, s_1^2}, \frac{max}{min}$$

Donde:

F: F experimental de test de Fischer-Snedecor

s_1: Desviación estándar del grupo control

s_2: Desviación estándar del grupo experimental

Que bajo la hipótesis nula sigue una distribución F-Snedecor. En el caso de no poder rechazar la hipótesis nula (p-valor > 0.05) se considera que las dos varianzas son iguales (homogéneas).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. CULTIVO CELULAR.

Las células de Neuroblastoma B35 utilizadas demostraron un buen desarrollo de crecimiento en el cultivo celular en esta investigación. Las células contienen un nivel bajo de colágeno, es por eso que se adhirieron a las paredes del *flask* donde se las colocó para desarrollarse [27]. Las células fueron creciendo gracias al DMEM y al FBS, que les proporcionó los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para su desarrollo.

Existen varias líneas celulares de las cuales la más usada es la B-35 debido a que demuestra propiedades neuronales y gracias a esto es la apropiada para esta investigación que fue realizada con un componente de la maca que también demuestran propiedades en cuanto al nivel neuronal [27].

En la siguiente figura (Figura III.1.) se puede demostrar el crecimiento y desarrollo de esta línea celular de acuerdo al aumento de cantidad de células con el paso del tiempo de incubación.



Figura III.1. Imágenes en microscopio invertido de Neuroblastoma B35.

1er dia de incubación: a,20x. b,100x. 2do dia de incubación: c,20x. d,40x. 3er día de incubación: e,40x. f,100x.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2. ANALISIS LC-MS/MS.

En el análisis de la N-bencilhexadecanamida (Coumpound 11) y el estandar interno la N-benciltetradecanamida (Compound 90) en el LC-MS/MS, las condiciones cromatografíasfueron adecuadas (Figura III.2 y Figura III.3) para aislar el pico de las muestras a investigar con una Fase Móvil de Agua (A) y Acetonitrilo (B) 45:55 respectivamente, donde el acetonitrilo contenía 0.1% de Ácido Fórmico, y demostró tener un tiempo de retención de 15 min dejándola correr por 30 min por muestra para una mejor lectura y evitar interferentes. Estos ensayos se realizaron basándose en anteriores investigaciones [19, 20].

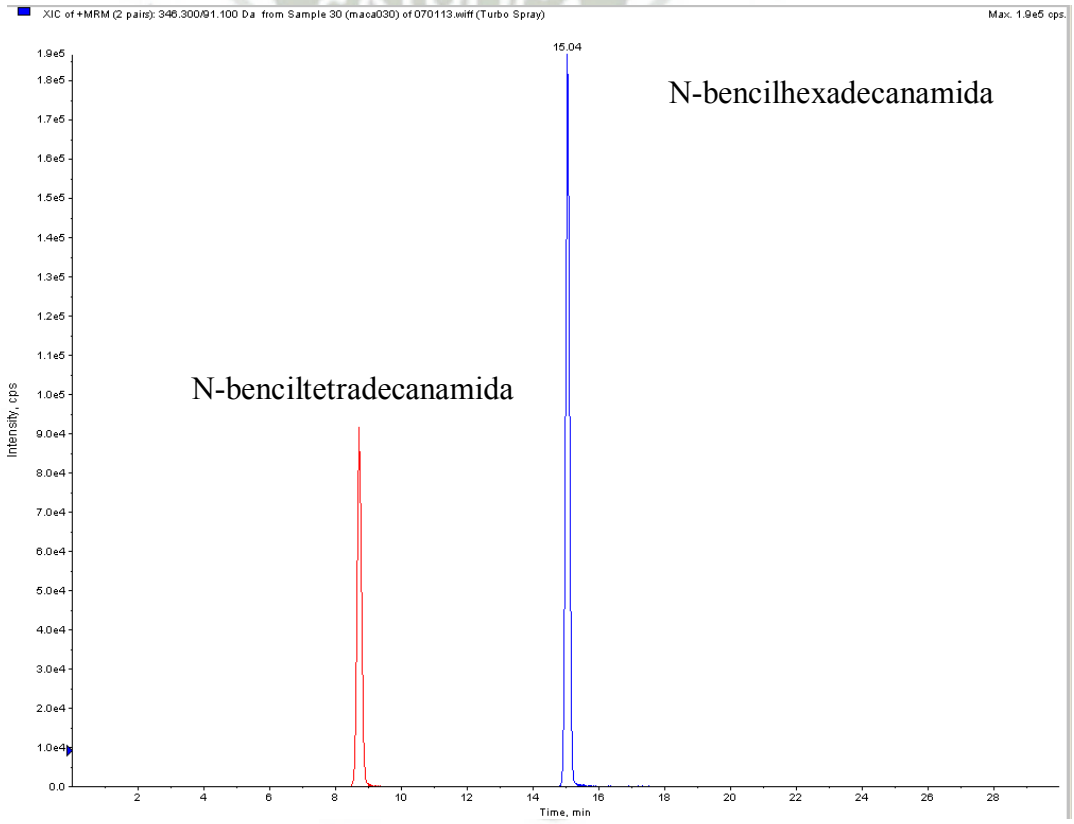


Figura III.2. LC-MS/MS cromatograma de N- bencilhexadecanamida en el Medio

El componente analizado no es detectable fácilmente ya que el LC-MS/MS tiene una sensibilidad muy alta por lo que se utilizó un estándar interno, que ya se había sido utilizado anteriormente en investigaciones [19], es decir, un componente estructuralmente similar al elemento a analizar, de concentración

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

conocida y que se comporte de manera similar, es decir, que tenga las mismas propiedades que el analito, pero que pueda ser distinguida para optimizar su precisión al ser detectada por el Espectrómetro de masas.

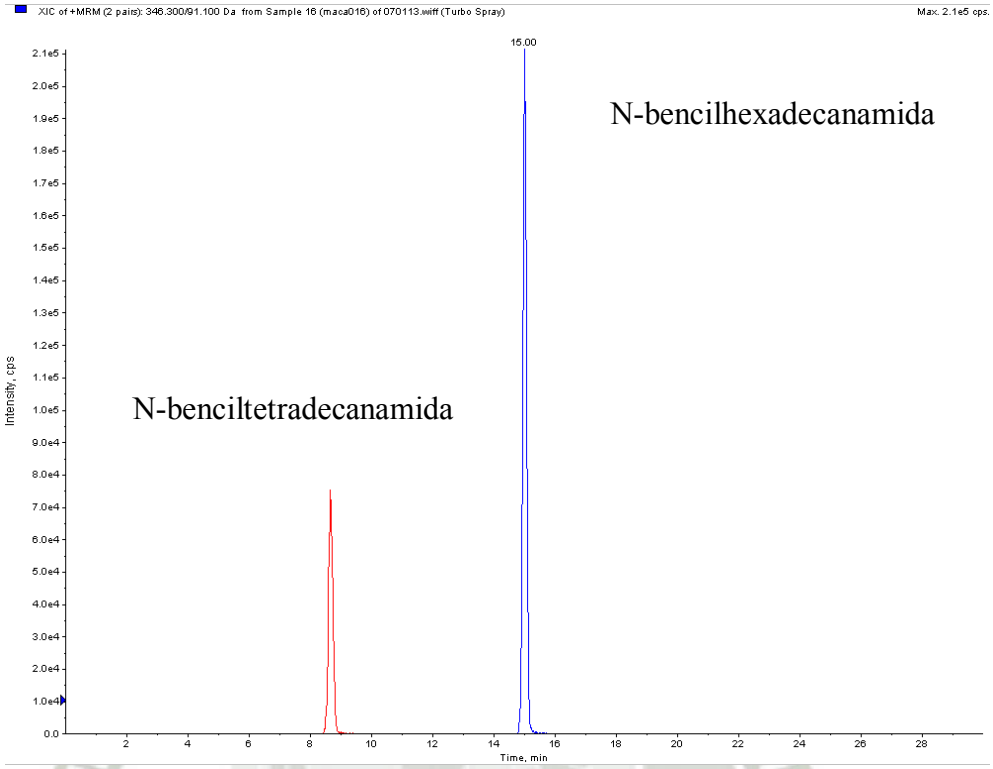


Figura III.3. LC-MS/MS cromatograma de N- bencilhexadecanamida en células

LC-MS/MS nos demuestra un método rápido y sensible para el análisis de muestras bioanalíticas pero sólo puede realizarla de forma fiable siempre y cuando se utilicen estándares internos marcados isotópicamente para cada analito que se cuantifica [52].

El componente utilizado como estándar interno fue el N-benciltetradecanamida (Compound 90), de la cual veremos su similitud en cuanto a su estructura con la N-bencilhexadecanamida (Compound 11) en la Figura III.4 y III.5.

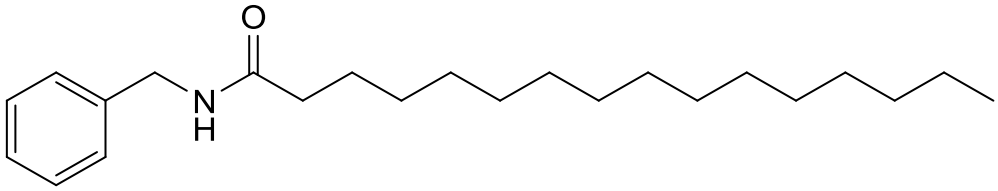


Figura III.4. N- bencilhexadecanamida (Compound 11)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

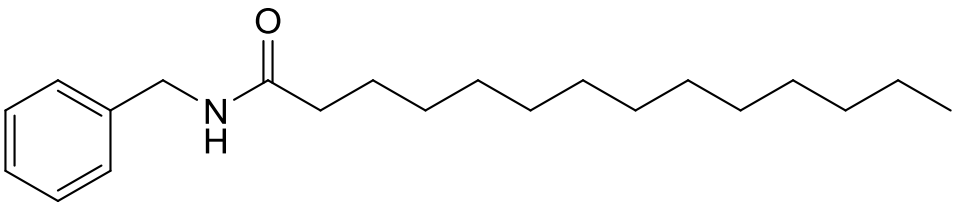


Figura III.5. N- benciltetradecanamida (Compound 90)

En Figura III.4 y Figura III.5 vemos que la diferencia estructuralmente entre ambos compuestos es de solo dos carbonos y cuatro hidrógenos [22].Al igual que la N-bencilhexadecanamida, la N-benciltetradecanamida también fue detectada junto con ella en los 30 minutos que se dejó correr, teniendo un tiempo de retención de 8 minutos. La elección del estándar interno debe ser muy cuidadosa debido a que puede conducir a resultados analíticamente pobres [33].

La técnica LC-MS/MS consistió en que cada ion molecular se filtró en la Q1 y los iones moleculares se fragmentaron con energías específicas de colisión para cada ión molecular en la Q2. Los Iones de productos únicos para cada compuesto se filtraron en la Q3 y se detectaron las señales amplificadas de los iones producto para luego ser procesadas en el software antes nombrado [19]. La selectividad, rapidez y sensibilidad de este método es mucho mejor del de otras técnicas utilizadas para este tipo de investigaciones [32].

2.1. Gráficos de las Curvas de Calibración.

Para la realización del gráfico de calibración se prepararon 4 estándares de concentración conocida de N-bencilhexadecanamida (1, 5, 10, 20 μM) y se procedió al análisis en LC-MS/MS.

El software Analyst 1.4.2 (AB/SCIEX) procesó los datos y calculó el área bajo la curva del pico de cada concentración de N-bencilhexadecanamida en el medio y en las células y se muestra los datos del medio en la Tabla III. 1 y su respectivo gráfico en la Figura III.6.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla III.1. Curva de calibración de N-bencilhexadecanamida en el Medio

Concentración (µM)	Área Bajo la Curva C 11	Área Bajo la Curva C 90	X/C 90	Área Bajo la Curva final
1	59.3	138	1	59.3
5	262	128	1.0781	282.47
10	590	142	0.9718	573.38
20	1320	155	0.8903	1175.23

Fuente: *Elaboración propia*

Para hallar X se escogió un dato medio de la Área Bajo la Curva del compuesto 90 y se dividió entre cada una de esas áreas (X/C 90), el dato utilizado fue 138. Posteriormente para hallar el Área Bajo la Curva final fue el resultado de la multiplicación del Área Bajo la Curva del compuesto 11 por la división hallada (X/C 90); con estos datos se procedió a realizar el gráfico.

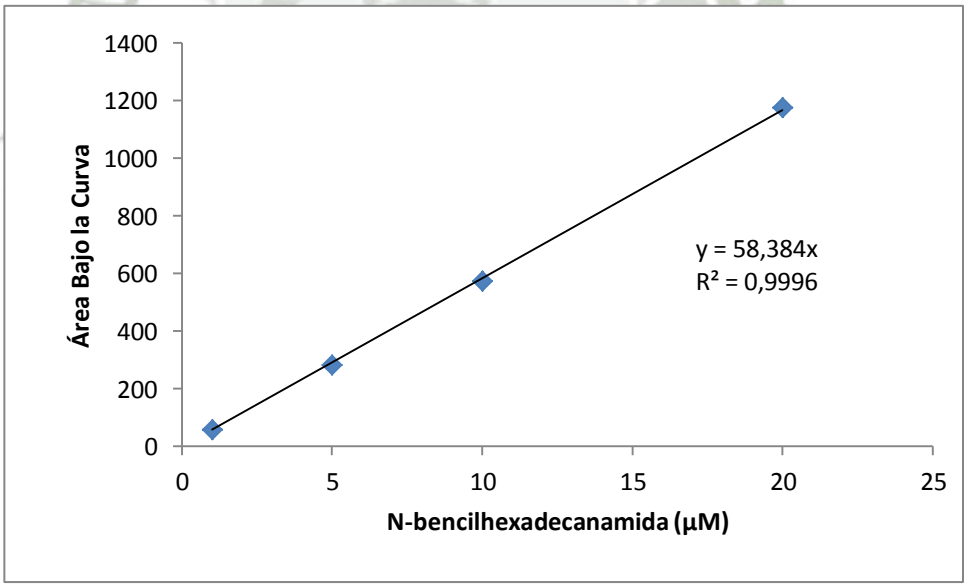


Figura III.6. Curva de calibración de N- bencilhexadecanamida en el Medio

Los datos obtenidos de las muestras de las células fueron procesados en la Tabla III.2 y se elaboró un gráfico de calibración con la concentración y el Área Bajo la Curva (ABC) que se encuentra en la Figura III.7. Este

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

gráfico demostró tener linealidad debido a que su coeficiente de relación (R^2) es cercano a 1 y fue determinado gracias a la ecuación obtenida de su línea de tendencia, además este gráfico nos proporciona la confiabilidad de usar los datos para la determinación de las concentraciones de N-bencilhexadecanamida a los diferentes tiempos y determinar su Farmacocinética *in vitro*.

Tabla III.2. Curva de calibración de N-bencilhexadecanamida en las Células

Concentración (µM)	Área Bajo la Curva C 11	Área Bajo la Curva C 90	X/C 90	Área Bajo la Curva final
1	163	884	0.9242	150.65
5	693	927	0.8813	610.77
10	1210	881	0.9274	1122.09
20	2630	970	0.8423	2215.16

Fuente: *Elaboración propia*

Lo mismo que la anterior tabla anterior la división fue realizada (X/C 90) y se realizó la multiplicación correspondiente para hallar el Área Bajo la Curva final.

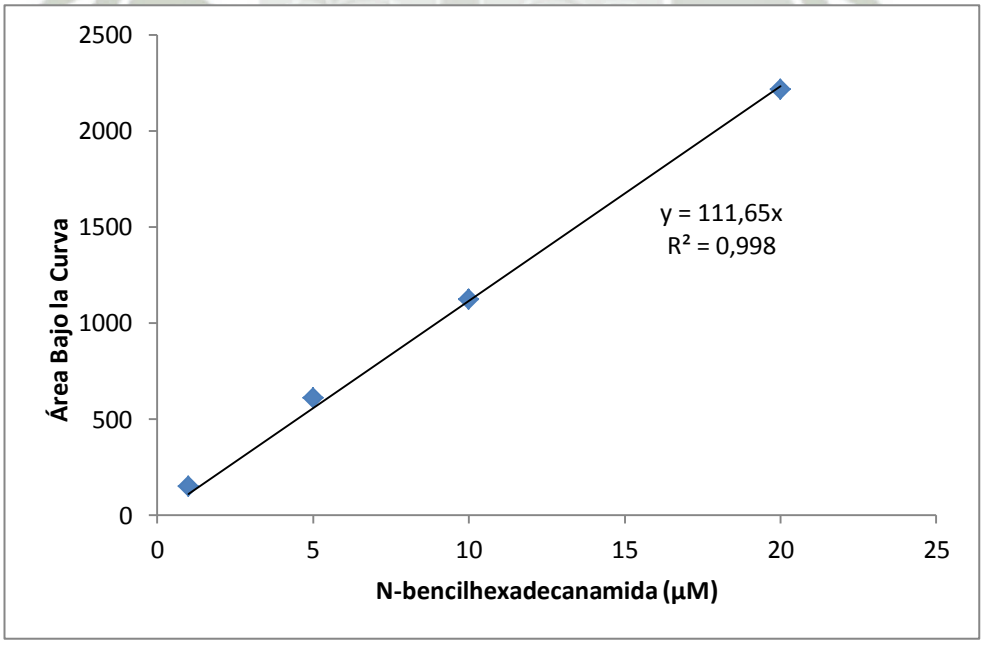


Figura III.7. Curva de calibración de N- bencilhexadecanamida en las Células

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

3. Análisis de Datos de N-bencilhexadecanamida.

3.1. EN EL MEDIO.

En la Tabla III.3 se muestra las concentraciones de la Macamida, en los diferentes tiempos (horas) y se ve que va disminuyendo la concentración inicial que fue en un inicio 10 µM, que fueron absorbidos por la línea celular Neuroblastoma B35, P es el promedio de las 4 repeticiones [42, 43].

Los datos de cada repetición se verán en el ANEXO II.

Tabla III.3. Datos de N-bencilhexadecanamida en el Medio

t (hrs)	P(C) en µM±DE
0	10
0.016	8.2058±1.8077
0.083	8.2567±1.3754
0.3333	8.5489±2.9208
0.25	7.0618±1.1557
0.5	7.1936±1.4627
1	8.2233±1.3787
2	5.9041±1.4902
4	5.1959±1.4980
6	6.8901±1.4546
12	4.2249±0.3817
24	3.0683±0.6315
36	2.4260±1.9804
48	0.7694±0.4074

Fuente: *Elaboración propia*

En la Figura III.8, el gráfico muestra que efectivamente la relación de las concentraciones y los tiempos fueron reduciéndose al paso de las horas, este experimento tuvo 4 repeticiones [41, 42].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

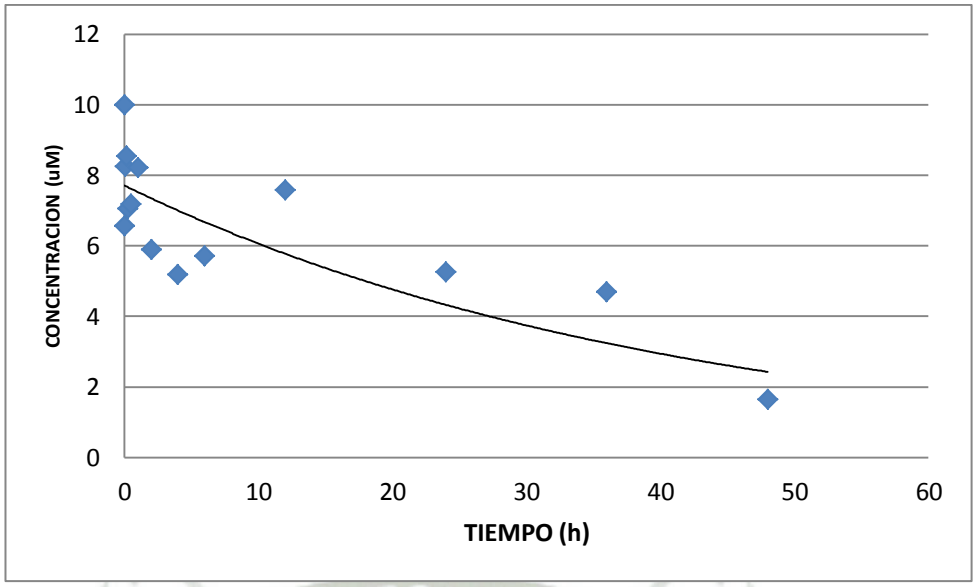


Figura III.8.Concentración vs. Tiempo de N- bencilhexadecanamida en el Medio

3.2. EN LAS CÉLULAS.

La Tabla III.4 se muestra que la concentración fue aumentando con el paso de las horas, debido a que las células Neuroblastoma B35 absorbieron la N-bencilhexadecanamida, pero para que los datos puedan ser graficados se convirtió de µM a nM por lo que la Figura III.10 muestra el gráfico con los datos de la tabla.

A estos datos se les añade la Desviación Estándar (DE) correspondientes a cada tiempo para saber su variabilidad y para mayor confiabilidad. Puede que los datos no sean exactos debido a algunos errores de calibración, errores casuales o aleatorios o condiciones experimentales no apropiadas en el momento de realizar el procedimiento.

Con estos datos elaboramos un gráfico (Figura III.9) y las repeticiones de las concentraciones se verán en el ANEXO III.

Para poder hallar la constante de absorción y el tiempo de vida media se procedió a separar los datos del grafico anterior (Figura III.9) a partir de las

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

12 horas ya que empieza a decaer, es decir eliminarse a partir de esa hora [44].

Tabla III.4. Datos de N-bencilhexadecanamida en las Células

t	PROMEDIO (nM)±DE
0.016	1.1622±0.2067
0.083	1.0167±0.2651
0.3333	1.1300±0.4485
0.25	1.4878±0.5294
0.5	1.2867±0.2242
1	1.9843±0.2635
2	4.8666±1.8729
4	6.0346±1.6829
6	8.8534±1.9993
12	16.7374±5.6702
24	18.1814±7.6116
36	18.2967±7.5019
48	16.0582±2.9931

Fuente: *Elaboración propia*

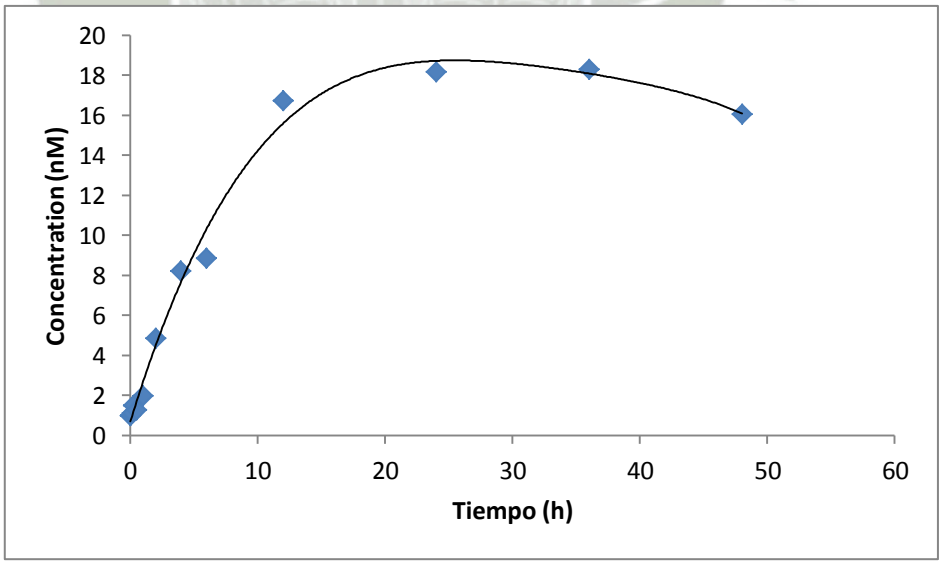


Figura IIII.9. Curva Concentración vs. Tiempo de N-bencilhexadecanamida en Células.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

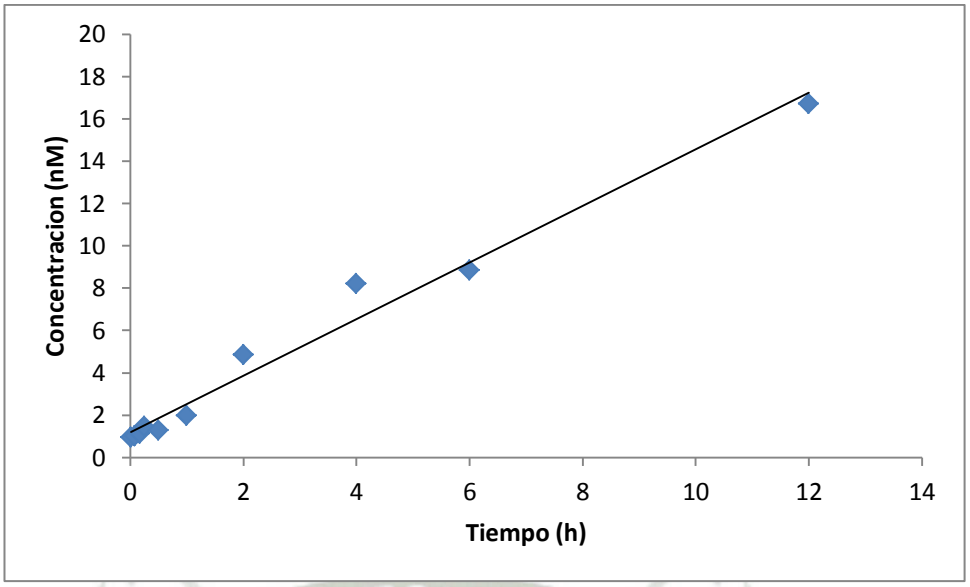


Figura IIII.10. Curva Concentración-Tiempo hasta 12h de N-bencilhexadecanamida en las Células

La ecuación y el coeficiente de relación hallados son:

$$y = bx + a$$

$$y = 1.3373x + 1.1772$$

Donde:

a= 1.1722

b= 1.3373

R^2= 0.9792

El gráfico elaborado mostrado en la Figura III.10 demuestra una linealidad gracias a su coeficiente de relación cercano a 1, donde se obtuvo una ecuación que nos proporcionara la confiabilidad de usarla para proceder a hallar los Parámetros Farmacocinéticos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Debido a que no se encuentran estudios acerca de la farmacocinética de la N-bencilhexadecanamida, podemos encontrar estudios similares con respecto a la farmacocinética, pero de otros compuestos [41-43].

Los datos concentración-tiempo se basó en la teoría de los momentos estadísticos, es decir, farmacocinética no compartimental y fueron ajustados al modelo lineal, donde aplicaremos la siguiente fórmula para hallar la constante (k_a) [44].

$$b = k_a$$

$$k_a = 1.3373\ h^{-1}$$

La constante de absorción de N-bencilhexadecanamida es 1.3373 h^{-1}en células de Neuroblastoma B35 con una concentración de 10 µM mientras que en células L1210 de ratones la farmacocinética con BCNU (1, 3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) muestra una constante de 0.0185 min^{-1} con una concentración de 20 µM [42].

De acuerdo con este resultado observamos que la constante de velocidad de absorción es 1.3373 h^{-1}, es decir que, por una unidad de tiempo (1 hora) será absorbida esa cantidad.

Y aplicamos la fórmula del tiempo de vida media de absorción, basándonos lo que propone Hiroko y col. [43].

$$t_{1/2a} = \frac{Ln\ 2}{k_a}$$

$$t_{1/2a} = \frac{0.693}{1.3373}$$

$$t_{1/2a} = 0.5182\ h$$

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

El tiempo de vida media de en este experimento es 0.51 horas, es decir, 31 min aproximadamente y en el experimento de BCNU es 37 min, lo que nos demuestra que tienen cierta relación en cuanto a su tiempo de vida media.

Gracias a este dato hallado podemos decir que los 31 minutos es el tiempo de vida media en que la mitad de la concentración de N-bencilhexadecanamida tarda en absorberse

Tabla III.5. Parámetros Farmacocinéticos

PF	Co (µM)	K_a (h^{-1})	$t_{1/2a}$ (h)	Cmáx (nM)	Tmáx (h)
Células	10µM	1.3373	0.5182	23.1953±7.50	36

Fuente: Elaboración Propia

La concentración utilizada en este experimento (10 µM) se debe a que tiene el mayor efecto inhibitorio al 50% en comparación con lo que dice Pino y col. [17,18].

La concentración máxima (Cmáx) es la concentración mayor a la que ha llegado la N-bencilhexadercanamida en el tiempo máximo (Tmáx) transcurrido del experimento.

Los Parámetros Farmacocinéticos de la N-bencilhexadecanamida hallados son útiles como para realizar otros experimentos como ver su mecanismo de acción así como su ingesta oral en humanos, etc., ya que las células utilizadas, Neuroblastoma B35, son útiles para estudios de diferenciación neuronal del SNC, por lo que nos da la idea de realizar más estudios a nivel neuronal.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE CÉLULAS.

El ensayo de viabilidad fue necesario para poder descartar alguna variación de la viabilidad en las células al momento del uso de la macamida (N-bencilhexadecanamida).

Se compararon dos grupos de muestras, una era el control que contenía células en Medio FBS incubadas por un día más el vehículo que fue DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%.y la otra eran las células, pero en vez del vehículo fue la macamida para ver su viabilidad en las células; ambas muestras se les agregaron MTS y fueron incubadas por 4h y luego llevadas al espectrofotómetro de platos para la lectura de la absorbancia a 490 nm.

Los datos obtenidos de la absorbancia se verán en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Absorbancia de la viabilidad de N-bencilhexadecanamida

	C11 (10 µM)	Control
n 1	1.739	0.422
n 2	0.891	0.451
n 3	0.549	0.638
n 4	0.807	0.905
n 5	0.649	1.502
Medias	0.927	0.7836
DS	0.4731	0.4453
ESM	0.4146	0.3504
% Viabilidad	118.30	100

Una vez obtenidos las absorbancias se procedió a hallar sus porcentajes de viabilidad en la Tabla III.7.

A partir de estos datos obtenidos se realizó primero el test F para análisis de varianzas iguales (Tabla III.8) seguido del test t de Student para análisis

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

de medias iguales (Tabla III.9) con el objetivo de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control, en ambas pruebas [48].

Tabla III.7. Porcentaje de la viabilidad de N-bencilhexadecanamida

% Viabilidad	C11 (10 µM)	Control
n 1	221.92	53.85
n 2	113.71	57.55
n 3	70.06	81.42
n 4	102.99	115.49
n 5	82.82	191.68
Medias	118.3002	100
DS	60.37228	56.83623
ESM	221.9245	53.85401

Tabla III.8. Prueba F para varianzas de la viabilidad del Neuroblastoma B35.

	C 11 (10 µM)	*Control*
Media	118.30	100
Varianza	3644.812	3230.357
Número de Muestras	5	5
Grados de libertad	4	4
F	1.1283	
P(F<=f) una cola	0.454843	
Valor crítico para F (una cola)	6.388233	

Fuente: Excel

Se evidenció que los resultados obtenidos en el test F (Tabla III.8) fue que las varianzas aceptan la hipótesis nula por lo que se procedió a realizar el test t (Tabla III.9) que demostró que no existe diferencia significativa (Figura III.11) al 95%, es decir, los promedios son equivalentes u homogéneos, demostrando así que la N-bencilhexadecanamida no influye en la viabilidad celular del Neuroblastoma B35.

Este ensayo es muy importante para comprobar que no existe daño alguno en las células por parte del analito, la muestra analizada.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Tabla III.9. Prueba t suponiendo varianzas iguales.

	C 11 (10 µM)	*Control*
Media	118.30	100
Varianza	3644.812	3230.357
Número de Muestras	5	5
Varianza agrupada	3437.585	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0.493512	
P(T<=t) una cola	0.317456	
Valor crítico de t (una cola)	1.859548	
P(T<=t) dos colas	0.634912	
Valor crítico de t (dos colas)	2.306004	

Fuente: Excel

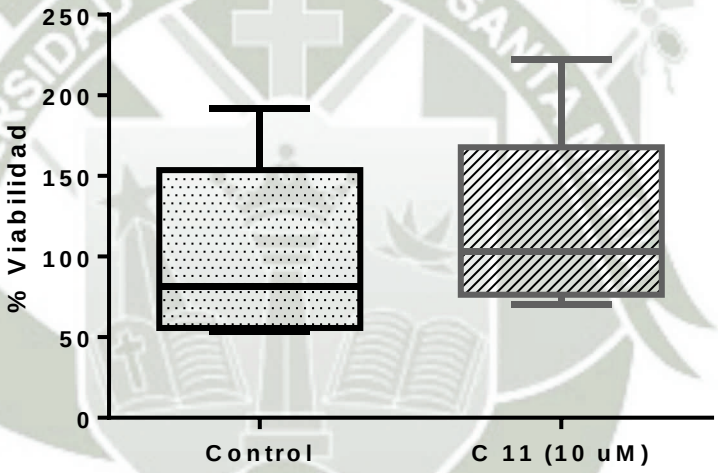


Figura III.11. Efecto de la N-bencilhexadecanamida sobre la viabilidad del Neuroblastoma B35 [50]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPITULO IV

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES.

1. Se cuantificó la N-bencilhexadecanamida de las células en el LC-MS/MS, por lo tanto se pudo hallar las concentraciones correspondientes a cada tiempo establecido, ya que, la línea celular Neuroblastoma B35 es capaz de absorber este compuesto en medio de cultivo DMEM con 10% de FBS, incubado a 37° en una atmosfera de 5% de CO_2.
2. Se determinaron los Parámetros Farmacocinéticos como la Concentración inicial que fue de 10 µM, una constante de absorción de 1.3373 h^{-1}, un tiempo de vida media de absorción de 31 minutos, una Concentración máxima de 23.20±7.50 nM y un Tiempo máximo de 36 horas.
3. Se encontró evidencia, a partir de los resultados del ensayo de viabilidad con MTS, de que la N-bencilhexadecanamida no influye en el normal desarrollo del Neuroblastoma B35.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

SUGERENCIAS.

1. Realizar estudios de estabilidad de la macamida sobre la línea celular Neuroblastoma B35, ya que su concentración no es estable dentro de ellas.
2. Utilizar Neuroblastoma B35 como modelo farmacológico en ensayos con componentes de la Maca, debido a sus propiedades a nivel neuronal.
3. Realizar ensayos a Neuroblastoma B35, para determinar más características de esta línea celular.
4. Realizar ensayos de Farmacocinética con otros componentes de la Maca para poder ver si hay similitud en cuanto a su absorción y eliminación.
5. Probar la Farmacocinética de esta macamida con otras concentraciones para saber si se detecta con buenos resultados.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

REFERENCIAS.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

REFERENCIAS

1. Muhammad, I.; Zhao, J.; Dunbar, D.; Khan, I. *"Constituents of Lepidium meyenii ´Maca´"*. Phytochemistry, 2002 (59), pp. 105-110.
2. Riega Alarcón, C.; Torres Vega, M. *"Efecto del Lepidium peruvianum Chacón sobre los niveles sanguíneos de testosterona en animales de experimentación"* Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico, Universidad Católica de Santa María, 2005.
3. Escamilo Cárdenas, Simón. *"Recuperación de productos nativos de los Andes: kiwicha y maca"* Revista de Antropología, 2008, pp. 193-200.
4. Castaño Corredor, M. Paola. *"Maca (Lepidium peruvianum Chacón): composición química y propiedades farmacológicas"* Fundación Instituto Suramericano de Plantas Medicinales. Bogotá (Colombia), 2007. Revista de Fitoterapia, 2008, pp. 21-28.
5. Gonzales, G. F.; Córdova, A.; Vega, K.; Chung, A.; Villena, A. *"Effect of Lepidum meyenii (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men"* Instituto de Investigaciones de la Altura, and Department of Biological and Physiological Sciences (Faculty of Sciences and Philosophyl), Universidad Peruana Cayetano Heredia, PO 1843, Lima, Peru. Journal of Endocrinology (2003) 176, pp. 163-168.
6. Castañeda, B.; Loja, B.; Puebla, P.; Gamarra, F.; Alvarado, A.; Muñoz, A. M.; Enriquez Valencia, Y.; Ibañez, L. *"Estudio Botánico y Fitoquímico de las Hojas secas de Maca de la Meseta de Bombón, Junín-Perú"* Revista Horizonte Médico, Volumen 10 Nº 1, Enero-Julio 2010, pp. 13-22.
7. Cuentas, R.; De la Cruz, L.; Hernández, G.; Mateo, I.; Castañeda, C.; Ibàñez, L.; Ramos, E. *"Evaluación del efecto antioxidante de Hojas de Lepidium peruvianum Chacón, MACA"*. Revista Horizonte Médico, Volumen 8, N°1, Julio 2008, pp. 45-55.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

8. Gonzales, G. *"Ethnobiology and ethnopharmacology of Lepidium meyenii (Maca), a plant from the Peruvian Highlands"*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, pp. 1-10.
9. Gonzales, G. *"Maca: Del alimento perdido de los Incas al milagro de los Andes, Estudio de Seguridad Alimentaria y Nutricional*" Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 2010, pp. 16-36.
10. Ochoa, C.; Don Ugent. *"Maca (Lepidium meyenii Walp.; Brassicaceae): A Nutritious Root Crop of the Central Andes*" Economic Botany, Vol. 55, No. 3 (Jul. - Sep., 2001). Published by: Springer on behalf of New York Botanical Garden Press, Bronx, NY, U.S.A, pp. 344-345.
11. Bianchi, A. *"Maca Lepidium meyenii"* Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Universidad de Santiago de Chile, Chile, vol. 2, núm. 3, mayo, 2003, pp. 30-36.
12. Ayambo Saavedra, L. D. *"Optimización del proceso de extracción etanólica de Lepidium peruvianum Chacón, Maca"*. Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2006.
13. Rosas Portugal, J. G. "*determinación del Efecto Antioxidante In vitro del Lepidium peruvianum Chacón (MACA)"* Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, 2004.
14. Gonzales, Gustavo F.; Miranda, Sara; Nieto, Jessica; Fernández, Gilma; Yucra, Sandra; Rubio, Julio; Yi, Pedro; Gasco, Manuel. "*Red maca (Lepidium meyenii) reduced prostate size in rats"* Reproductive Biology and Endocrinology, 2005, 3:5. Published by: BioMed Central
15. Gonzales, C.; Rubio, J.; Gasco, M.; Nieto, J.; Yucra, S.; Gonzales, Gustavo F. *"Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of Lepidium meyenii (MACA) on spermatogenesis in rats"* Department of Biological and Physiological Sciences, Faculty of Sciences and Philosophy, Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana Cayetano Heredia, P.O. Box 1843, Lima, Peru, 18 August 2005.
16. Marín-Bravo, Manuel. *"Histologia de la Maca, Lepidium meyenii Walpers (Brassicaceae)"* Revista Peruana de Biología, 10 (1): 101 -1080, 2003. Facultad de Ciencias Biologicas, UNMSM.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

17. Pino-Figueroa, A., Nguyen, D. and Maher, T. J. *"Neuroprotective effects of Lepidium meyenii (Maca)"* Annals of the New York Academy of Sciences, 2010 (1199), pp. 77–85.

18. Pino-Figueroa, A.; Vu, H.; Kelley, Ch.; Maher, T. *"Mechanism of action of Lepidium meyenii (Maca): An explanation for its neuroprotective activity"*. American Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration, 3, 2011, pp. 1–6.

19. Ganzera, M.; Zhao, J.; Muhammad, I.; Khan, I. *"Chemical Profiling and Standardization of Lepidium meyenii (Maca) by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography".* National Center for Natural Products Research, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, The University of Mississippi; University, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi; University, February 12, 2002; accepted March 28, 2002, pp 988-991.

20. Pino-Figueroa Alejandro, Böhlke Mark, Wu Hui, Kelley Charles, Williams David A., Maher Timothy J. *"An approach to standardize Lepidium meyenii (Maca) extracts by evaluating macamide content with an LC-MS/MS method".* Department of Pharmaceutical Sciences, Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, 2012.

21. Obregón Vilchez, L. *"Maca, Planta Medicinal y Nutritiva del Perú"* Ed. Instituto de Fitoterapia Americana, 1997.

22. Wu, H.; Kelley, C.; Pino-Figueroa, A.; Vu, H.; Maher, T. *"Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of in vitro FAAH inhibition"* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013 (21), pp. 5188-5197.

23. Arias Ramírez, Angela R. *"Biotecnología y metabolitos secundarios en Lepidium peruvianum Chacón, Maca"* Tesis para la obtención del título de Biólogo con Mención Genética, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 2002.

24. McCollom, M.; Villinski, J.; McPhail, K.; Craker, L.; Gafner, S. *"Analysis of macamides in samples of Maca (Lepidium meyenii) by HPLC-UV-MS/MS"* John Wiley & Sons, Ltd., Phytochem Analysis, 2005, 16: pp. 463-469.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

25. Chain, Fernando E.; Grau, Alfredo; Martins, José C.; Catalán, César A.N. *"Macamides from wild 'Maca', Lepidium meyenii Walpers (Brassicaceae)"* Phytochemistry Letters 8 (2014), pp. 145–148.
26. Zhao, Jianping; Muhammad, Ilias; Dunbar, D. Chuck; Mustafa, Jamal; Khan, Ikhlas A. *"New Alkamides from Maca (Lepidium meyenii)"* Department of Pharmacognosy and National Center for Natural Products Research, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, The University of Mississippi, University, Mississippi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, pp. 690-693.
27. Otey CA, Boukhelifa M, Maness P. *"B35 Neuroblastoma cells: An easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons"* Methods Cell Biology, 2003(71), pp. 287-304.
28. Rondón Ortiz, A. N.; Villanueva Sardón, R. J. *"Efectos De Isoniacida, Vigabatrina, Gabapentina Y Extracto Pentánico De Lepidium Meyenii L. (Maca) Sobre Los Niveles De Gaba Producidos Por Neuroblastoma B35"* Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico, Universidad Católica de Santa María, 2014.
29. Wagner, J. G. "*Fundaments of Clinic Pharmacokinetics"* en versión española *"Farmacocinética Clínica"* Editorial Reverté, Barcelona, España. 1983.
30. Schoenwald, Ronald D. "*Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development"* Edited, CRC Press, USA, 2002.
31. Malgor, L. A.; Valsecia M. E. "*Capitulo 2: Farmacología General: Farmacocinética"* Farmacología Médica, Volumen 1, 2005, pp. 13-32.
32. Wang, Z.; Hop, C. E.; Leung, K. H.; Pang, J. *"Determination of in vitro permeability of drug candidates through a Caco-2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry"* Journal of Mass Spectrometry, 2000, 35, pp. 71-76.
33. Adepu, N.; Kumanan, R., Rao, K.; Nageswera Rao, P.; Kumar, R.; Duganath, N. "*LC-MS/MS analytical method for the estimation and validation of nutraceutical: Niacin in human plasma"* Pelagia research Library, Der Pharmacia Sinica, 2010, 1(1): pp. 116-123.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

34. Weng, N.; Halls, T. D. J. *"Systematic Troubleshooting for LC/MS/MS. Part 2: Large-Scale LC/MS/MS and Automation"* BioPharm, Process Development. January 2002, pp 22-26.
35. Korfmacher, Walter A. *"Principles and applications of LC-MS in new drug discovery"* Foundation review, Volume 10, Number 20, 2005, pp. 1357-1367.
36. *"Basics of LC/MS"* A Primer Hewlett-Packard Company 1998.
37. Roškar, Robert; Trdan Lušin, Tina. "*Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples"* Chapter 4 of Cromatography: The Most Versatile Method of Chemical Analysis. InTech, 2012, pp. 79-126.
38. Ni, Jinsong; Rowe, Josh. *"Microdosing Assessment to Evaluate Pharmacokinetics and Drug Metabolism Using Liquid Cromatography-Tandem Mass Spectrometry Technology"* Topics on Drug Metabolism, Edited by Dr. James Paxton, InTech. Department of Drug Safety evaluation, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA, 2012, pp. 247-264.
39. ATCC (www.atcc.org).
40. Obregón Vilches, Lida. *"Maca. Planta medicinal y nutritiva del Perú"* Instituto de Fitoterapia Americano, Universidad de Texas, 1998.
41. Portier, Agnès; Cascais, Anne Christine; Funk, Christoph; Lavé, Thierry. *"Predicction of pharmacokinetic profile of valsartan in human based on in vitro uptake transport data".* Journal of Pharmacokinetic Pharmacodyn. Springer Science + Business Media, LLC, 2009, pp. 36:585-611.
42. Ueda-Kawamitsu, Hiroko; Lawson, Terence A.; Gwilt, Peter R. *"In vitro pharmacokinetics and pharmacodynamics of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)".* Biochemical Pharmacology, 63 (2002), Elsevier, pp. 1209-1218.
43. Litjens, Nicole; van Strijen, Elisabeth, van Gulpen, Co; Mattie, Herman; van Dissel, Jaap T; Thio, H. Bing; Nibbering, Peter H. *'In vitro pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters". BioMed Central Pharmacology, Netherlands, 2004, pp. 1471-2210.*
44. Aguilar Ros, Antonio; Caamaño S., Manuel; Martín M., F. R.; Montejo R., M. Consuelo. *"Biofarmacia y Farmacocinética: Ejercicios y Problemas resueltos". Primera Edicion. Elsevier, Barcelona- España, 2008.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

45. Promega Corporation "*CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay".* Technical Bulletin.Instructions for Use of Products G3580, G3581 and G3582.*USA, 2012.*

46. American Type Culture Collection. "*MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K".* Instruction Guide, USA, 2011.

47. Vilar Fernandez, Juan M. *"Modelos Estadísticos Aplicados, Tablas estadísticas".* Publicaciones de la Universidad de Coruña, monografía 101. Segunda Edición. ISBN: 84-9749-196-3. España, 2006.

48. Castro Díaz, Sandra L. "*Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de Isertia Laevis empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos".* Tesis para la obtención del título de Bióloga, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia, 2006.

49. *"t-Student y F-Snedecor".* Plan de Formación en Bioestadística, Modulo 8. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 2010.

50. Prism (version 5.01 for Windows; GraphPad Software Inc., San Diego, CA), 2015 (http://www.graphpad.com/).

51. Lic. González de Apodaca, María Teresa. "Monografía de *Lepidium meyenii*". Asociación Argentina de Fitomedicina. Curso Posgrado: Fitomedicina. 2009.

52. Holstege, Ph.D., D. "The Use of Internal Standard Calibration with LC/MS/MS Bioanalytical Methods". Pharmaceutical Outsource Solutions, Inc, 2003.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO I. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DMEM.

Component	g/L
Inorganic Salts	
Calcium Chloride	0.2
Ferric Nitrate • $9H_2O$	0.0001
Magnesium Sulfate (anhydrous)	
Potassium Chloride	0.4
Sodium Bicarbonate	3.7
Sodium Chloride	6.4
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109
L-Arginine • HCl	0.084
L-Cystine • 2HCl	—
Glycine	0.03
L-Histidine • HCl • H_2O	0.042
L-Isoleucine	0.105
L-Leucine	0.105
L-Lysine • HCl	1.46
L-Methionine	—
L-Phenylalanine	0.066
L-Serine	0.042
L-Threonine	0.095
L-Tryptophan	0.016
L-Tyrosine • 2Na •$2H_2O$	0.10379
L-Valine	0.094
Vitamins	
Choline Chloride	0.004
Folic Acid	0.004
***myo*-Inositol**	0.0072
Niacinamide	0.004

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004
Pyridoxal • HCl	—
Pyridoxine • HCl	0.004
Riboflavin	0.0004
Thiamine • HCl	0.004
Other	
D-Glucose	
Phenol Red • Na	0.0159
Pyruvic Acid • Na	0.11
Add	
L-Glutamine	0.584

[39]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO II. TABLA DE LAS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO

t (h)	A (µM)	B (µM)	C (µM)	D (µM)
0	9.04279689	9.04279689	9.04279689	9.04279689
0.016	1.68815332	7.18742218	10.29287	7.137027
0.083	9.37895779	6.976295	9.51137	7.160272
0.3333	7.67963873	7.03218809	12.87969	6.604417
0.25	8.21140624	6.3244904	7.869827	5.841584
0.5	7.83636605	7.14720091	8.601959	5.18871
1	9.8241272	6.62481983	8.762594	7.681518
2	7.03437051	4.22336172	5.081876	7.276714
4	7.3572869	4.13004286	5.051273	4.245308
6	6.7954035	2.21294462	8.389705	5.485149
12	3.95495429	4.49482318	8.788873	13.13096
24	2.62174414	3.51480436	8.197575	6.713987
36	-	2.42600557	6.090402	5.559956
48	1.23119127	0.61673086	4.25658	0.460431

Fuente: *Elaboración propia*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO III. TABLA DE LAS CONCENTRACIONES EN LAS CÉLULAS

t (h)	A (nM)	B (nM)	C (nM)	D (nM)
0	0	0	0	0
0.016	0.41251745	1.39950677	1.06570513	1.0213155
0.083	0.75867008	1.35403129	0.86016414	1.093965
0.3333	1.00514906	1.79369396	0.82720588	0.8941155
0.25	1.34394111	2.25693627	1.04644495	1.303767
0.5	1.19756056	1.22806283	1.61409198	1.1072115
1	1.92823546	1.76475288	1.87800481	2.366022
2	5.39135516	7.22574324	3.93658981	2.912874
4	6.36011487	14.8001761	7.53096847	4.2128055
6	6.27338695	9.99494414	8.34865196	10.796772
12	15.1796365	24.7116455	11.3095238	15.748785
24	19.26629	28.4454755	13.7073864	11.306604
36	-	28.5	17.890625	8.49963
48	19.7871445	15.0991263	16.7001147	12.646509

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO IV. Tabla de t-student

Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO IV. Tabla de Fischer-Snedecor, α=0.05

$n_2 \setminus n_1$	1	2	3	4	5	6
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis