



Optimización de la extracción de glucosinolatos de maca (*Lepidium meyenii*) por superficie de respuesta y algoritmos genéticos

Optimization of maca (*Lepidium meyenii*) glucosinolates extraction by genetic algorithms and response surface

Vásquez-Villalobos, Víctor^{1,*}; Rojas-Padilla, Carmen¹; Rojas-Naccha, Julio¹; Hernández-Bracamonte, Orlando²; Vásquez-Angulo, Julia³; Barreto-Alama, Omar³

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agroindustriales, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

² Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

³ Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

Received May 5, 2016. Accepted July 19, 2016.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue comparar la optimización del proceso de extracción de glucosinolatos totales de harina de maca (*Lepidium meyenii*) (EGTHM) utilizando SR por diseño Box-Behnken (SRBB) con el de AG, en función a x_1 : temperatura (°C), x_2 : etanol (%), x_3 : relación solvente/materia prima y x_4 : tiempo de extracción (min). Se identificó y cuantificó los GT utilizando HPLC. Se evaluaron las variables (x_1 , x_2 , x_3 , x_4) que influyen en la extracción utilizando un SRBB con el software *Statistica* y *Wolfram Mathematica* para los AG. Del desarrollo del SRBB se obtuvo una ecuación de segundo orden con $R^2 = 0,74794$, $p = 1,88248E-10 \ll 0,05$ con error absoluto medio de 11%; lo que indicó la consistencia del modelo. No fue posible obtener un valor óptimo de la EGTHM utilizando SRBB, por la existencia de dos zonas óptimas debido a la configuración de una superficie tipo silla. Empleando AG se obtuvo después de 2000 iteraciones el valor máximo de la función de 17,0986 μmol de GT/g de HM, el cual se alcanzó con 69,9783 °C, 70,9540% de etanol, relación solvente/materia prima de 10,0488 en 90 min, lo que demuestra la aplicabilidad de los AG.

Palabras clave: algoritmos genéticos, superficie de respuesta, optimización, secado, maca (*Lepidium meyenii*).

Abstract

The aim this work was to compare the extraction process optimization of total glucosinolates of maca flour (*Lepidium meyenii*) (ETGMF) using RS for Box-Behnken (RSBB) Design with that of GA, according to x_1 : temperature (°C), x_2 : ethanol (%), x_3 : ratio solvent/raw material and x_4 : extraction time (min). TG were identified and quantified using HPLC. The variables (x_1 , x_2 , x_3 , x_4) that influence their extraction were evaluated using a RSBB with the software *Statistica* and *Wolfram Mathematica* for the AG. From the development of the RSBB, a second order equation with $R^2 = 0.74794$, $p = 1.88248E-10 \ll 0.05$ with 11% average absolute error was obtained; it showed the consistency of the model. It was not possible to obtain an optimal value of the ETGMF using RSBB because of the existence of two optimal zones due to the configuration of a chair surface. After 2000 iterations using GA, the maximum value of the function of 17.0986 μmol of TG/g of MF was obtained, which was reached with 69.9783 °C, 70.9540 ethanol%, 10.0488 ratio solvent/raw material in 90 min, which demonstrates the applicability of the GA.

Keywords: genetic algorithms, response surface, optimization, drying, maca (*Lepidium meyenii*).

* Corresponding author

E-mail: vvasquez@unitru.edu.pe (V. Vásquez-Villalobos).

© 2016 All rights reserved.

DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.03.16

1. Introducción

La maca (*Lepidium meyenii* Walpers) es una especie nativa de los Andes Peruanos que se cultiva principalmente en la Meseta del Bombón en el Departamento de Junín - Perú (Marín-Bravo, 2003). La maca se adaptó a condiciones ecológicas muy frías donde otro cultivo no podría prosperar; estas zonas se caracterizan por tener bajas temperaturas, alta irradiación solar, heladas frecuentes, vientos fuertes y suelos ácidos ($\text{pH} < 5$) (Red Informática UNALM, 2013). Según los cronistas de los siglos XVI y XVII, las tropas incas eran alimentadas con raciones de maca, atribuyéndose propiedades de brindar vitalidad y fortaleza a los combatientes (Lock y Rojas, 2002). Se reporta que la maca tiene un contenido de 59% de carbohidratos, 2,2% de lípidos y 10,2% de proteínas (Dini *et al.*, 1994). Asimismo se reporta la presencia de glucosinolatos en la maca fresca, con un mayor contenido en las semillas, seguido de las raíces frescas y plántulas. La harina de maca se ubica en el séptimo lugar. Los glucosinolatos identificados en la harina de maca son: glucoalisin, glucosinalbin, glucotropaeolin, glucolimnatin (Li *et al.*, 2001; Piacente *et al.*, 2002). La mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa, E.C.3.2.3.1) es el agente responsable de la hidrólisis de los glucosinolatos (Nastruzzi *et al.*, 1996).

Los glucosinolatos y sus productos derivados son de interés particular pues se le confiere propiedades anticancerígenas. Se reporta que puede bloquear la formación inicial de tumores mediante la modulación de las actividades de fase I y II por biotransformación de enzimas y supresión de tumores por apoptosis (Mithen *et al.*, 2000). Estudios en animales experimentales y en cultivos celulares han reportado evidencias de que las verduras del género *Brassica* y sus constituyentes son capaces de inducir selectivamente enzimas de fase II. Verhoeven *et al.* (1997) han presentado una recopilación sistemática de las pruebas sobre inducción de enzimas de fase II por dos clases de productos de degradación de los gluco-

sinolatos, los isotionatos y el indol-3-carbinol. Se ha prestado especial atención a la inducción de enzimas fase II provocadas por sulforofano, derivado del isotiocianato del brócoli (Talalay *et al.* 1995). Wattenberg (1981) ha mostrado que tanto las verduras crucíferas como el bencilisotiocianato pueden inhibir la aparición de tumores en animales de experimentación, incluso cuando se administran mucho tiempo después de la exposición al agente carcinógeno. Se ha demostrado recientemente que los isotiocianatos son capaces de inducir apoptosis en cultivos celulares y en las criptas colorectales de las ratas, tras un tratamiento con el carcinógeno dimetilhidrazina; efecto que se asocia con una reducción de las lesiones precancerosas (Smith *et al.*, 1998).

Cuando en investigaciones se aplica la metodología de superficie de respuesta (MSR) se busca: (1) una razonable distribución de puntos de datos a través de la región de interés, (2) adecuación del modelo, (3) realización de experimentos en bloque, (4) construcción en forma secuenciada de diseños de alto orden, (5) estimación el error interno, (6) estimación precisa de los coeficientes de los modelos, (7) contar con un buen perfil de la predicción de la varianza a través de la región experimental, (8) no requerir un gran número ejecuciones experimentales (Montgomery y Runger, 2012). Box y Behnken (1960) propusieron algunos diseños formados por la combinación de factoriales $2k$ con diseños de bloques incompletos. El diseño resultante es usualmente muy eficiente en términos del número de corridas requeridas y cualquiera de ellos es rotatable o cercanamente rotatable. Este diseño es esférico con todos los puntos perteneciendo a una esfera de radio $\sqrt{2}$. Asimismo no contiene puntos en los vértices de la región cúbica creada por el límite más alto y más bajo para cada variable.

De acuerdo a Sarkar y Modak (2003) en la ausencia de soluciones analíticas, las soluciones numéricas son inevitables y varias técnicas de optimización numérica han sido reportadas en los últimos años

para la optimización. Los algoritmos genéticos (AG) son una forma novedosa de atacar el problema y su concepción parte, que al examinar el desarrollo evolutivo, el hombre se ha dado cuenta que la naturaleza durante el transcurso de los siglos, ha ido optimizando a todas las especies vivas para que puedan dominar mejor el mundo que las rodean para poder sobrevivir, y se ha dado cuenta también de que esta optimización es realizada a través de la genética y la selección natural. Por tanto, no resulta descabellado pensar en simular estos mecanismos y utilizarlos para resolver el problema de la optimización de sistemas de otro tipo. La principal ventaja de los AG radica en que son capaces de evadir los extremos locales de las funciones, pero tienen en su contra la cantidad de operaciones que hay que realizar. Existen varios puntos en los que un AG difiere de los métodos tradicionales de búsqueda y optimización. Un AG trabaja sobre parámetros codificados llamados individuos de la variable que se quiere optimizar, que inicialmente son generados aleatoriamente. Busca la solución mediante una aproximación de una población de puntos, en lugar de una aproximación de punto por punto como hacen los otros métodos. Utiliza reglas probabilísticas de búsqueda en lugar de reglas determinísticas. Trabaja directamente sobre la función y no sobre la derivada ni ninguna otra función auxiliar. Tiene tres operadores básicos que son: selección, cruce y mutación. Los parámetros que controlan el desempeño del AG son la probabilidad de cruce, probabilidad de mutación, tamaño de la población, etcétera (Cabezas, 2002).

La optimización tradicional es una actividad laboriosa que consume tiempo y no describe el efecto interactivo entre las variables. Por el contrario el método experimental estadístico basado en la MSR es un método que ahorra de tiempo y puede representar el efecto interactivo entre las variables. Para la aplicación de un modelo de SR, un modelo cuadrático es usualmente construido para describir el

efecto interactivo entre las variables y se puede utilizar para modelar y optimizar bioprocesos.

Los AG exploran todas las regiones del espacio usando una población de individuos, cada individuo representa un conjunto de variables independientes. Inicialmente, se forma una población de individuos al azar. La potencialidad de cada individuo es evaluada mediante una función de la aptitud. Al término de la evaluación de esta, se aplican operaciones genéticas como mutación y cruce que son aplicados a individuos seleccionados según su aptitud, para producir la próxima generación de individuos que continuaran siendo evaluados hasta encontrar una solución óptima (Wang y Wan, 2009).

En el contexto de lo expresado, en la presente investigación se estudió la optimización del proceso de extracción de glucosinolatos totales de harina de maca (EGTHM), utilizando superficie de respuesta por diseño Box-Behnken (SRBB) y algoritmos genéticos (AG).

2. Materiales y métodos

Material biológico: Harina de maca proporcionada por el Instituto Nacional de Desarrollo Agroindustrial (INDDA) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú).

Material de laboratorio: Cartuchos Sep-Pack 6 cc (Waters®); filtros de membrana GV 0,22 µm de poro 47 mm de diámetro; filtros de membrana PVDF para muestras HPLC 0,22 µm de poro 13 mm de diámetro (Millipore®); film de laboratorio (Parafilm®), viales para HPLC 1,5 mL (Waters®).

Reactivos y enzimas: Acetato de bario 99% (Riedel de Hæen®); acetato de plomo trihidratado 99,9% (Himedia®); acetato de sodio anhidro 99,9% (Mallinckrodt®); acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific®); ácido acético glacial 99,84%, alcohol etílico absoluto 99,9%, metanol 99,9% (Fermont®); agua ultrapura (milliQ); alcohol etílico 96% (Montana®); cloruro de sodio ≥ 99,5%, hidróxido de sodio 99% (Merck®); enzima sulfatasa de

Helix pomatia de 10 KU tipo H-1, gel de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-25 (Sigma®); estándar de glucosinolato para HPLC, hidrato de Sinigrin ≥ 99% (Fluka®); estándar de glucosinolato para HPLC, bencilglucosinolato, H₂O, K⁺ (KLV®), nitrógeno líquido.

Equipos: Agitador magnético (Ceramag®); agitador vortex (Velp Scientifica®); balanza analítica capacidad 210 g x 0,0001 g, balanza semianalítica 400 g x 0,1 g (Ohaus®); baño maría (Gesellschaft®); bomba de vacío (Vacuubrand®); centrífuga (Hettich®); degasificador (Bransonic®); destilador (bionet®); estufa de vacío (Shel Lab®); liofilizador (Labconco®); potenciómetro (Thermo Orion®); sistema de purificación de agua (Millipore®); cromatografo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con módulo de separación modelo 2695 XE (Waters®) equipado con: detector de fotodiodos modelo 2996 (PAD) y software Empower, columna dC₁₈ 5µm partícula 4,6 x150 mm d.i. (Waters®), pre-columnas dC₁₈ 5µm partícula 4,6 x 20mm d.i. (Waters®). Software: *Statistica* (www.statsoft/support/free-statistica-9-trial/) y *Wolfram Mathematica* (www.wolfram.com/mathematica/trial/).

Metodología: Para la optimización del proceso de extracción de los glucosinolatos totales de harina de maca (EGTHM) se siguió la secuencia mostrada en la Fig. 1.

a. Identificación de los glucosinolatos. Se utilizó tejidos vegetales con idénticos glucosinolatos a la harina de maca, comparándose el tiempo de retención y espectro de absorción.

b. Evaluación del efecto de las variables. Temperatura de extracción (30, 50, 70 °C), concentración de etanol (50, 75, 100%), relación solvente/materia prima (10/1, 15/1, 20/1) y tiempo de extracción (30, 60, 90 min); en la concentración de glucosinolatos totales de los extractos de harina de maca (µmol/g de harina).

Metodología de superficie de respuesta

Se utilizó un diseño Box-Behnken (α = 0,05) con cuatro variables independientes

(x₁, x₂, x₃, x₄) con tres niveles para cada una (Tabla 1).

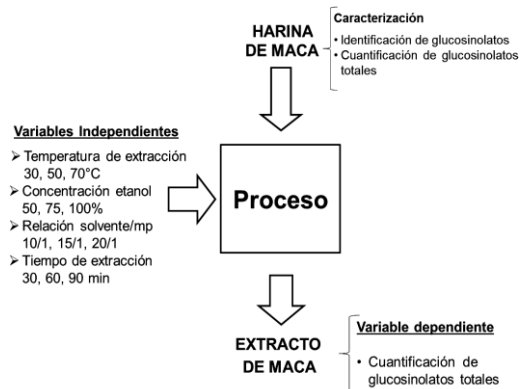


Figura 1. Secuencia experimental para obtención extractos de harina de maca y cuantificación de los glucosinolatos totales.

Tabla 1

Variables que influyen en la concentración de los glucosinolatos totales con sus respectivos niveles experimentales

Variables independientes	-1	0	1
x ₁ : temperatura (°C)	30	50	70
x ₂ : etanol (%)	50	75	100
x ₃ : solvente/materia prima	10/1	15/1	20/1
x ₄ : tiempo (min)	30	60	90

En concordancia con las variables y niveles de la Tabla 1 se estableció una matriz para el desarrollo experimental (Tabla 2) siguiendo el diseño Box-Behnken que relaciona las variables independientes (x₁, x₂, x₃, x₄) con la variable dependiente (Y₁): glucosinolatos totales de los extractos de harina de maca (GTEHM).

Se determinó la significancia estadística entre las variables con el empleo de software *Statistica*; obteniéndose un modelo matemático de segundo orden (ecuación 1), lo que posibilitó elaborar la superficie de respuesta (SR) y superficie de contornos, permitiendo ubicar la región de optimización.

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{44}x_4^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 + \beta_{34}x_3x_4 \quad (1)$$

Dónde β₀, β₁, β₂, β₃, β₄, β₁₁, β₂₂, β₃₃, β₄₄, β₁₂, β₁₃, β₁₄, β₂₃, β₂₄, β₃₄: coeficientes de regresión; x₁, x₂, x₃, x₄: variables independientes; Y₁: variable dependiente.

La obtención de los extractos se llevó a cabo siguiendo la secuencia de la Figura 2. La harina de maca (5 g) preparada de acuerdo a las relaciones solvente/materia prima (alcohol/harina de maca) de 10/1, 15/1 y 20/1, se mezclaron con etanol a concentraciones de 50, 70 y 100%.

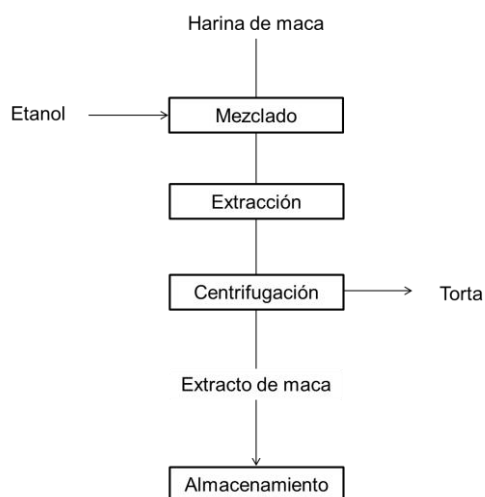


Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención de extractos de harina de maca.

Las operaciones realizadas para obtención de extractos de harina de maca fueron:

Mezclado. Manteniendo la relación solvente/materia prima (Tabla 2), se mezcló el solvente con la harina de maca hasta obtener una base uniforme, lo cual se logró agitando la mezcla por 1 minuto a 3000 rpm en un vortex.

Extracción: Se realizó en baño maría a la temperatura y tiempo consignada en la matriz (Tabla 2) a agitación constante de 180 vueltas/minuto en todos los tratamientos.

Centrifugación: Se realizó a 4000 rpm por 15 minutos.

Almacenamiento: El extracto sobrenadante se colocó en frascos ámbar conservándose a menos -20 °C para análisis posterior.

Aplicación de algoritmos genéticos

(AG): Se generaron poblaciones (cromosomas) a partir de una población inicial construida aleatoriamente (Singh *et al.*, 2008), dichas poblaciones “evolucionaron” en cada generación (iteración) para

adquirir un mejor valor de aptitud en comparación con sus predecesores (Lim *et al.*, 2000). Los valores de la aptitud de la progenie generados en cada iteración se evaluaron mediante la función de la aptitud (ecuación 2) (Singh *et al.*, 2008). Para reproducir las nuevas generaciones, se utilizaron tres operadores genéticos: selección, cruce (*crossover*) y mutación; los cuales se llevaron a cabo hasta lograr una solución óptima. En este sentido se programó un algoritmo utilizándose el software *Wolfram Mathematica*, utilizándose una población de 30 individuos, con un número de genes por cromosoma de 54, probabilidad de cruce (*crossover*) de 0,25 y probabilidad de mutación de 0,01. Con dominios para x_1 [30; 70], x_2 [50; 100], x_3 [10; 20], x_4 [30; 90]; con sus correspondientes número de genes para $x_1=18$, $x_2=15$, $x_3=12$, $x_4=9$.

Análisis fisicoquímico

Determinación de humedad y materia seca: Se empleó la metodología A.O.A.C. (1990) basada en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento hasta obtener peso constante.

Determinación de glucosinolatos de acuerdo a la metodología reportada por Verkerk *et al.* (2001). Este análisis es realizado para harina de maca y para sus extractos, siguiendo secuencialmente 4 pasos:

a. **Extracción:** Se empleó 1 g de muestra con 10 mL de metanol al 70% a 75 °C. Posterior a una centrifugación (4000 rpm x 10 min) se obtuvo un sobrenadante.

b. **Precipitación de proteínas y de iones sulfato libres:** Se empleó por cada 5 mL de sobrenadante 100 µL de acetato de plomo 0,3 M y acetato de bario 0,3 M en la misma cantidad.

c. **Purificación y desulfatación:** se realizó con minicolumna de intercambio aniónico, filtro y enzima sulfatasa purificada para desulfatar los glucosinolatos.

d. **Análisis en HPLC:** los desulfoglucosinolatos se analizaron con HPLC con detector *Photodiode Array* (PDA) a una longitud de onda de 229 nm, usando una

columna de separación dC_{18} en fase reversa (4,6x150 mm; 5 μ m) a una temperatura de 28°C. Velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Fase móvil: agua MilliQ (A) y acetonitrilo 100% (B). Tiempo de corrida 46 min mediante un sistema de gradiente: gradiente lineal (98% A- 2% B) hasta una composición de 75% A-25% B. Los glucosinolatos se expresaron en base a equivalentes de sinigrin (glucosinolato disponible comercialmente) con su respectiva curva estándar. El contenido de cada glucosinolato se expresó en μ mol/g.

3. Resultados y discusión

Metodología de superficie de respuesta

(MSR): El contenido de GTHM fue de 51,807 μ mol/g (2,15% MS) y de los

GTEHM en μ mol/g de harina obtenidos a través del desarrollo de la secuencia experimental se observa en la Tabla 2. Ciska *et al.* (2000) mencionan que el contenido de glucosinolatos en vegetales crucíferos es altamente variable, dependiendo de la edad de la planta y factores ambientales que causan el amplio rango de valores para vegetales de la misma variedad. Mulabagal y Tsay (2004) señalan que un número de factores físicos y químicos como el componente del medio, pH, temperatura y aireación afectan la producción de fitoquímicos. Asimismo Kliebenstein *et al.* (2005) indican que los perfiles de glucosinolatos están determinados principalmente por factores abióticos tales como el suministro de nitrógeno, azufre o potasio.

Tabla 2

Glucosinolatos totales en harina de maca (Y_1) obtenidos por extracción con etanol utilizando el Diseño Experimental Box-Behnken

Tratamientos	Variables codificadas independientes				Valores reales de las variables independientes				Glucosinolatos totales de extractos de harina (μ mol/g de harina)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_1 (°C)	x_2 (%)	x_3 (sol/mp)	x_4 (min)	Y_1
1	-1	-1	0	0	30	50	15	60	11,71
2	1	-1	0	0	70	50	15	60	10,18
3	-1	1	0	0	30	100	15	60	4,06
4	1	1	0	0	70	100	15	60	5,28
5	-1	0	-1	0	30	75	10	60	10,01
6	1	0	-1	0	70	75	10	60	10,58
7	-1	0	1	0	30	75	20	60	10,19
8	1	0	1	0	70	75	20	60	10,74
9	-1	0	0	-1	30	75	15	30	14,41
10	1	0	0	-1	70	75	15	30	10,98
11	-1	0	0	1	30	75	15	90	9,87
12	1	0	0	1	70	75	15	90	9,41
13	0	-1	-1	0	50	50	10	60	10,67
14	0	1	-1	0	50	100	10	60	8,060
15	0	-1	1	0	50	50	20	60	9,59
16	0	1	1	0	50	100	20	60	5,01
17	0	-1	0	-1	50	50	15	30	10,49
18	0	1	0	-1	50	100	15	30	4,58
19	0	-1	0	1	50	50	15	90	9,84
20	0	1	0	1	50	100	15	90	5,28
21	0	0	-1	-1	50	75	10	30	10,29
22	0	0	1	-1	50	75	20	30	9,71
23	0	0	-1	1	50	75	10	90	21,03
24	0	0	1	1	50	75	20	90	10,50
25	0	0	0	0	50	75	15	60	9,75
26	0	0	0	0	50	75	15	60	9,75
27	0	0	0	0	50	75	15	60	9,75
28	0	0	0	0	50	75	15	60	9,75

x_1 : temperatura de extracción (°C); x_2 : concentración de etanol (solvente) (%); x_3 : relación solvente/materia prima; x_4 : tiempo de extracción (min).

De la evaluación de la temperatura, concentración de etanol, relación solvente/harina de maca y tiempo de extracción de glucosinolatos de harina de maca, utilizando un diseño experimental Box-Behnken, se obtuvo un modelo de 2° orden (ecuación 2), con un $R^2 = 0,74794$ y un R^2 ajustado = $0,47649$, los cuales son valores bajos, sin embargo un valor elevado de R^2 no implica necesariamente que el modelo de regresión sea adecuado. De acuerdo Montgomery y Runger (2012) los modelos que tienen valores elevados de R^2 pueden producir predicciones pobres.

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & 4,580932 - 0,218101 * x_1 + \\
 & 0,000288 * x_1^2 + 0,515113 * x_2 - \\
 & 0,004349 * x_2^2 - 0,438458 * x_3 + \\
 & 0,049456 * x_3^2 + 0,003310 * x_4 + \\
 & 0,001376 * x_4^2 + 0,001373 * x_1 * x_2 + \\
 & 0,0012239 * x_1 * x_4 - 0,003940 * x_2 * \\
 & x_3 + 0,000450 * x_2 * x_4 - 0,016587 * \\
 & x_3 * x_4
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

Dónde Y_1 : glucosinolatos totales de los extractos de harina de maca ($\mu\text{mol/g}$ de harina de maca); x_1 : temperatura ($^{\circ}\text{C}$); x_2 : etanol (%); x_3 : solvente/materia prima; x_4 : tiempo (min).

En contraposición un análisis de varianza indicó la consistencia del modelo ($p = 1,88248\text{E}-10 \ll 0,05$). Se tomaron en cuenta todas las variables en su forma de expresión lineal y cuadrática, así como sus interacciones, eliminándose por su baja significancia el efecto de la interacción temperatura de extracción * solvente / materia prima (Figura 3).

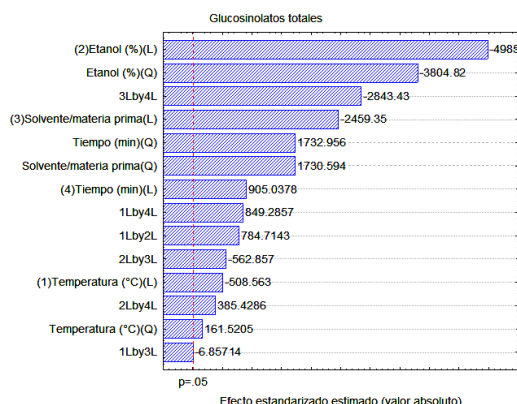


Figura 3. Efecto lineal, cuadrático y de las interacciones de las variables que influyen en la extracción de GTHM.

Utilizando el modelo de 2° orden se obtuvieron los respectivos valores predichos de GTEHM los que fueron comparados con los valores experimentales obtenidos, encontrándose un error absoluto medio de 11%. La dispersión entre los valores experimentales de los GTEHM ($\mu\text{mol/g}$ de harina) (valores observados) y los valores predichos, se observa en la Figura 4.

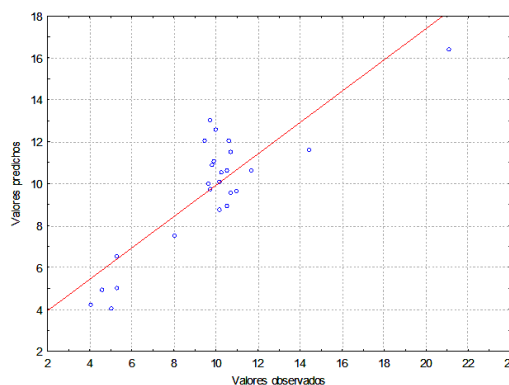


Figura 4. Glucosinolatos totales de los extractos de harina de maca (valores observados) en relación con los valores predichos empleando el modelo de segundo orden.

Los gráficos de contornos se muestran a continuación (Figuras 5, 6 y 7), observándose para las relaciones tiempo-temperatura, tiempo-porcentaje de etanol, tiempo- solvente/materia prima, que existen dos zonas de región óptima.

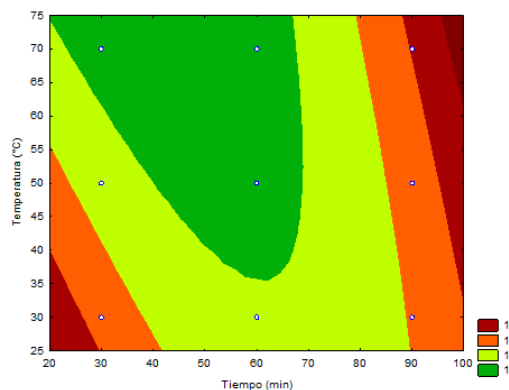


Figura 5. Superficie de contornos de los GTEHM en función del tiempo y temperatura de extracción.

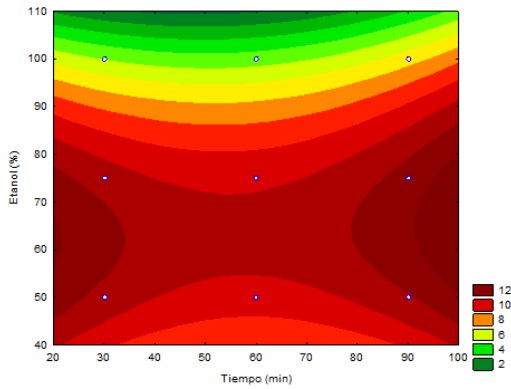


Figura 6. Superficie de contornos de los GTEHM en función del tiempo y porcentaje de etanol.

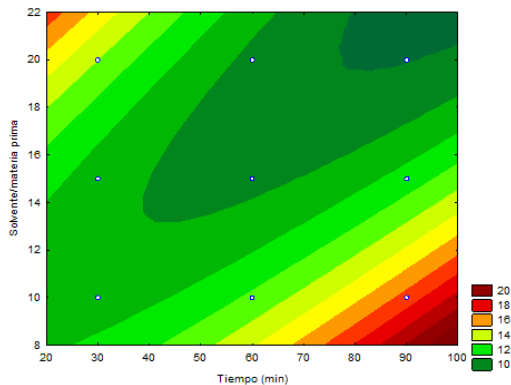


Figura 7. Superficie de contornos de los GTEHM en función del tiempo y relación solvente/materia prima.

Maximización de la función

EL modelo formal que representa los glucosinolatos totales es la función:

$$f = UC R^4 \rightarrow R \quad Y_1 \rightarrow f(Y_1)$$

Dónde: $u = [30; 70] \times [50; 100] \times [10; 20] \times [30; 90]$

En función a la ecuación (2), los puntos críticos de la función f , fueron:

$$\frac{\partial f(x_1)}{\partial x_1} = 0; \frac{\partial f(x_2)}{\partial x_2} = 0; \frac{\partial f(x_3)}{\partial x_3} = 0; \frac{\partial f(x_4)}{\partial x_4} = 0 \quad (3)$$

De donde se obtuvo el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} -0,218101 + 0,000576 x_1 + 0,001373 x_2 + 0,001239 x_4 &= 0 \\ 0,515113 + 0,001373 x_1 - 0,008698 x_2 - 0,00394 x_3 + 0,00045 x_4 &= 0 \\ -0,438458 - 0,00394 x_2 + 0,098912 x_3 - 0,016587 x_4 &= 0 \\ 0,00331 + 0,001239 x_1 + 0,00045 x_2 - 0,016587 x_3 + 0,002752 x_4 &= 0 \end{aligned}$$

Siendo la solución en el punto crítico de:

$$Y_0 = (69,4761; 65,2736; 19,0059; 71,398)$$

Utilizando la matriz Hessiana construida a partir de f , para poder afirmar que el punto crítico encontrado Y_0 , tiene como imagen un valor extremo de f , se utilizó el siguiente criterio:

- a) Si todos los autovalores de H son positivos, f tiene un mínimo relativo en Y_0 .
- b) Si todos los autovalores de H son negativos, f tiene un máximo relativo en Y_0 .
- c) Si H tiene autovalores positivos y negativos, f tiene un punto de silla en Y_0 .

En el caso de la presente investigación la matriz Hessiana fue la siguiente:

$$H = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_1 \partial x_1} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_1 \partial x_2} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_1 \partial x_3} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_1 \partial x_4} \\ \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_2 \partial x_1} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_2 \partial x_2} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_2 \partial x_3} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_2 \partial x_4} \\ \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_3 \partial x_1} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_3 \partial x_2} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_3 \partial x_3} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_3 \partial x_4} \\ \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_4 \partial x_1} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_4 \partial x_2} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_4 \partial x_3} & \frac{\partial^2 f(Y_1)}{\partial x_4 \partial x_4} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,000576 & 0,001373 & 0 & 0,001239 \\ 0,001373 & -0,008698 & -0,00394 & 0,00045 \\ 0 & -0,00394 & 0,098912 & -0,016587 \\ 0,001239 & 0,00045 & -0,016587 & 0,002752 \end{pmatrix}$$

Obteniéndose los siguientes autovalores: $\lambda_1 = 0,101835$, $\lambda_2 = -0,00904976$, $\lambda_3 = 0,00162102$, $\lambda_4 = -0,000864529$

De acuerdo con el criterio: el punto Y_0 es un punto silla (no es máximo y no es mínimo). Este criterio no descarta la existencia de un punto máximo (mínimo), únicamente afirma que Y_0 es un punto silla.

Algoritmos genéticos

Con algoritmos genéticos se obtuvo el valor máximo para f de 17,0986 después de 2000 iteraciones. El valor máximo se alcanzó en el punto:

$$(x_1, x_2, x_3, x_4) = (69,9783; 70,9540; 10,0488; 90,0000)$$

En la Figura 8, se observa la secuencia de las iteraciones, la que después de 2000, el valor máximo de la función fue de 17,0986 μmol de glucosinolatos totales/g de harina de maca, el cual se alcanzó con 69,9783 °C, 70,9540 % de etanol, relación solvente/materia prima de 10,0488 en 90 min, lo que demuestra la importancia del empleo de los AG. Al respecto Douglas *et al.* (2006) sostiene que los AG son técnicas de gran utilidad en la optimización de funciones que son difíciles de tratar haciendo uso de las técnicas de optimización clásica. Se utilizó una población de 30 individuos, con un número de genes por cromosoma de 54, probabilidad de cruce (*crossover*) de 0,25 y probabilidad de mutación de 0,01. Con dominios para x_1

[30; 70], x_2 [50; 100], x_3 [10; 20], x_4 [30; 90]; con sus correspondientes número de genes para $x_1=18$, $x_2=15$, $x_3=12$, $x_4=9$.

Ayambo (2006) obtuvo en un proceso optimizado 4,7 mg de glucosinolatos/g de maca. En la presente investigación se obtuvo 7,1 mg de glucosinolatos/g (17,0986 μmol de glucosinolatos/g) un valor superior en un 51%. Campos *et al.* (2013) utilizaron un diseño Box Behnken para evaluar el efecto de la temperatura, relación líquido sólido, tiempo y concentración de etanol, en la extracción de glucosinolatos.

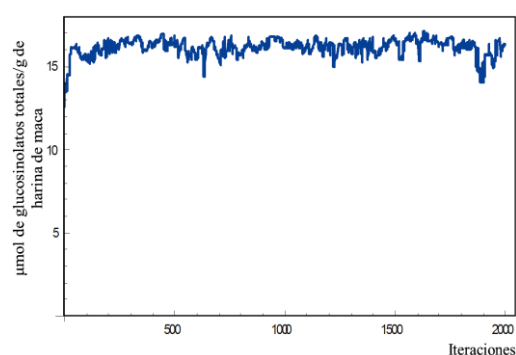


Figura 8. Secuencia de las iteraciones con algoritmos genéticos para la optimización de la extracción de los GTHM.

La relación entre la respuesta y las cuatro variables seleccionadas fueron aproximadas por una función polinómica de segundo orden, generando superficies de respuesta. Obtuvieron un coeficiente de determinación (R^2) de 0,88. Determinaron las condiciones de extracción óptima de glucosinolatos de 16,1 $\mu\text{mol/g}$ de masa seca (harina de maca) los cuales fueron a una temperatura de extracción de 47 °C, 60% de etanol, relación sólido líquido de 10 en 90 min. Asimismo por superposición de superficies de contorno de la concentración de etanol de 55% y de relación líquido sólido de 10:1, a una temperatura de 65 °C y 90 min; obtuvieron un rendimiento de 14,3 $\mu\text{mol/g}$ de masa seca, lo cual fue validado experimentalmente habiendo obtenido un rendimiento de 17,34 $\mu\text{mol/g}$ de masa seca.

4. Conclusiones

No fue posible obtener un valor óptimo de los glucosinolatos totales de extractos de harina de maca utilizando MSR con el software *Statistica* ya que de la observación de los gráficos de contornos y de superficie de respuesta, se observó la existencia de dos zonas de región óptima y del análisis matemático de la función obtenida por MSR se obtuvo solo un punto de una silla, el cual no es el máximo ni el mínimo. Empleando AG programados en el software *Wolfram Mathematica*, se obtuvo después de 2000 iteraciones el valor máximo de la función de 17,0986 μmol de glucosinolatos totales/g de harina de maca, el cual se alcanzó con 69,9783 °C; 70,9540% de etanol, relación solvente/materia prima de 10,0488 en 90 min, lo que demuestra la importancia del empleo de los AG.

Referencias

- A.O.A.C. Association of official Analytical Chemists International. 1990. Official Methods of Analysis. 15 ed. Arlington, USA. 1154 pp.
- Ayambo, L. 2006. Optimización del proceso de extracción etanólico de *Lepidium peruvianum* Chacón. Tesis Facultad Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Box, G.; Behnken, D. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455-475.
- Cabezas, C. 2002. Tecnología Química. Volumen XII. N° 2. Universidad del Oriente. Pp. 65-69.
- Campos, D.; Chirinos, R.; Barreto, O.; Noratto, G.; Predereschi, R. 2013. Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*). *Industrial Crops and Products* 49: 747-754.
- Ciska, E.; Matyniak-Przybysszewka, B.; Kozłowska, H. 2000. Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48: 2862-2867.
- Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P.; Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food chemistry* 49(4): 347-349.
- Douglas, R.; Maldonado, J.L.; Borges, R.; Colmenares, G. 2006. Aplicación de los algoritmos genéticos para estimar los parámetros en un modelo de regresión de Cox. *Economía* 22: 57-74.
- Kliebenstein, D. J.; Kroymann, J.; Mitchell-Olds, T. 2005. The glucosinolate-myrosinase systems in an ecological and evolutionary context. *Current Opinion in Plant Biology* 8(3): 264-271.
- Li, G.; Ammermann, U.; Quiroz, C. 2001. Glucosinolate Contents in Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) Seeds, Sprouts Mature Plants and Several Derived

- Commercial Products. *Economic Botany* 55(2): 255-262.
- Lim, M.H.; Yuan, Y.; Omatu, S. 2000. Efficient genetic algorithms using simple genes exchange local search policy for the quadratic assignment problem. *Comput Optim Appl.* 15:249-268.
- Lock, O.; Rojas, R. 2002. Química y Farmacología de *Lepidium meyenii* Walp. (“maca”). *Revista Química* 16(1-2): 25-31.
- Marín-Bravo, M. 2003. Histología de la Maca *Lepidium meyenii* Walpers (*Brassicaceae*). *Rev. Peru. Biol.* 10(1): 101-108.
- Mithen, R.; Dekker, M.; Verkerk, R.; Rabot, S.; Johnson, I. 2000. Review: The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J Sci Food Agric.* 80: 967–84.
- Montgomery, D.C.; Runger, G.C. 2012. Probabilidad y Estadística Aplicadas a la Ingeniería. Edit. Limusa, S. A. de C. V. Pp. 817.
- Mulabagal, V.; Tsay, 2004. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineerin.* 2: 29-48.
- Nastruzzi, C.; Cortesi, R.; Esposito, E.; Menegatti, E.; Leoni, O.; Iori, R.; Palmieri. 1996. In Vitro Cytotoxic Activity of Some Glucosinolate-Derived Products Generated by Mirosinase Hydrolysis. *Journal Agrocultural Food Chemistry* 44(4): 1014-1021.
- Piacente, S.; Carbone, V.; Plaza, A.; Zampelli, A.; Pizza, C. 2002. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp). *J Agric Food Chem.* 50(20): 5621-5625.
- Sarkar, D.; Modak, J. 2003. Optimisation of fed-batch bioreactors using genetic algorithms. *Chemical Engineering Science* 58: 2283 – 2296.
- Singh, A.; Majumder, A.; Goyal, A. 2008. Artificial intelligence based optimization of exocellular glucansucrase production from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Bioresour Technol.* 99: 8201-8206.
- Smith, T.; Lund, E.; Johnson, I.; 1998. Inhibition of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and induction of apoptosis in rat colon following oral administration of the glucosinolate sinigrin. *Carcinogenesis* 19(2): 267-273.
- Talalay, P.; Fahey, J.; Holtzclaw, W.; Prester, T.; Zhang, Y. 1995. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett.* 82/83: 173-179.
- Red Informática UNALM-Universidad Agraria la Molina. 2013. La Maca. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/programa/maca/#INTRODUCCION>
- Verhoeven, D.; Verehagen, H.; Goldbohm, R.; van den Brandt, P.; van Poppel, G.; 1997. Review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* 103(2): 79-129.
- Verkerk, R.; Dekker, M.; Jongen, W.M.F. 2001. Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of Brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(9): 953-958.
- Wang, J.; Wan, W. 2009. Optimization of fermentative hydrogen production process using genetic algorithm based on neural network and response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 255 – 261.
- Wattenberg, L. 1981. Inhibition of Carcinogen-Induced Neoplasia by Sodium Cyanate, tert-Butyl Isocyanate, and Benzyl Isothiocyanate Administered Subsequent to Carcinogen Exposure. *Cancer Research* 41: 2991-2994.