



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN
QUELITES DE LA FAMILIA *AMARANTHACEAE*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. LAURA MORALES TOLEDO

TUTOR

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	Dr. Manuel Soriano García
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Vocal	Dra. Claudia Delgadillo Puga
Secretaria	Dr. José Fausto Rivero Cruz

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, laboratorio 321, Edificio E, Facultad de Química UNAM

Se presentó en la modalidad cartel en la 11ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada del 20 al 22 de mayo del 2015 en San Carlos, Sonora, México.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría (No. de becario 308251).

Al apoyo económico de CONACYT 2012-CB180128.

Al apoyo económico del proyecto PAPIIT-UNAM IN220015.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por guiarme a través de todo este proceso y brindarme las herramientas para realizarlo. Le agradezco todo las sus enseñanzas y el apoyo en todo este tiempo.

A la colaboración de

M. en C. Francisco Basurto Peña, Instituto de Biología UNAM, por brindar las colectas de quelites con las que se trabajó en esta investigación.

Dr. Ernesto Sánchez Mendoza, UAM-X, por la ayuda técnica en la obtención de los espectros de RMN.

A la Dra. Claudia Delgadillo Puga y Q.A. Yesica Cruz Martínez, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, por la determinación de rutina por HPLC.

A la Dra. Cristina Mapes Sánchez, Instituto de Biología UNAM, por la ayuda bibliográfica y asesoría de quelites en este trabajo.

Al jurado asignado para la revisión de tesis: Dr. Manuel Soriano García, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Amanda Gálvez Mariscal, Dr. Fausto Rivero Cruz y Dra. Claudia Delgadillo Puga, por las contribuciones y revisiones de este trabajo.

A mis profesores de la maestría y compañeros del laboratorio 321.

i) Índice

1. Resumen.....	7
2. Introducción	8
3. Marco teórico.....	10
3.1 Los quelites, plantas comestibles de México	10
3.1.1 Etnobotánica de los quelites	12
3.1.2 Formas de consumo de quelites	14
3.2 Quelites de la familia <i>Amaranthaceae</i>	15
3.2.1 Taxonomía y características botánicas del género <i>Amaranthus</i>	16
3.2.2 Diversidad de quintoniles en la Sierra Norte de Puebla	18
3.2.3 Composición nutrimental.....	20
3.3 Compuestos bioactivos	21
3.3.1 Betalaínas	23
3.3.2 Compuestos fenólicos	27
3.3.2.1 Ácidos fenólicos.....	28
3.3.2.2 Flavonoides	29
3.3.3 Lípidos.....	32
4. Justificación	36
5. Hipótesis.....	36
6. Objetivos	37
6.1 Objetivos generales.....	37
6.2 Objetivos particulares	37
7. Desarrollo experimental.....	38
7.1 Reactivos	40
7.2 Equipos	40
7.3 Procedimiento	40
7.3.1 Etapa 1. Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos totales.....	40
7.3.1.1 Tratamiento de la muestra.....	41
7.3.1.2 Determinación de betalaínas totales	41
7.3.1.3 Determinación de fenoles totales	42
7.3.1.4 Procesamiento de muestras (diferente colecta de quelites)	42

7.3.1.5 Determinación de compuestos totales	43
7.3.1.6 Identificación de compuestos por CCF.....	44
7.3.2 Etapa 2. Cuantificación de compuestos por HPLC Y CG	45
7.3.2.1 Cuantificación de amarantina	46
7.3.2.1 Cuantificación de ácidos fenólicos	48
7.3.2.2 Cuantificación de rutina	49
7.3.2.3 Cuantificación de escualeno.....	49
7.4 Análisis estadístico	50
8. Resultados y discusión	51
8.1 Etapa 1. Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos totales.....	51
8.1.1 Tratamiento de la muestra.....	51
8.1.2 Procesamiento de muestras (diferente colecta de quelites)	52
8.1.3 Determinación de compuestos totales	53
8.1.4 Identificación de compuestos por CCF.....	57
8.2 Etapa 2. Cuantificación de compuestos por HPLC Y CG	63
8.2.1 Cuantificación de amarantina	63
8.2.2 Cuantificación de ácidos fenólicos	70
8.2.3 Cuantificación de rutina	73
8.2.4 Cuantificación de escualeno.....	75
9. Conclusiones.....	77
10. Perspectivas	78
11. Referencias.....	79
12. Anexos	86

ii) Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la milpa	10
Figura 2. Tipos de quelites	11
Figura 3. Datos estadísticos de la producción de quelites en México	12
Figura 4. Localización de los sitios arqueológicos estudiados en la cuenca de México	13
Figura 5. Quelites: <i>izquimilitl</i> , <i>quiltonilli</i> , <i>aixochiquilitl</i>	14
Figura 6. Formas de cocinado de quelites.....	15
Figura 7. Quelites de la familia <i>Amaranthaceae</i>	16
Figura 8. Variedad de hojas en el género <i>Amaranthus</i>	19
Figura 9. Estructuras químicas de compuestos bioactivos	21
Figura 10. Estructura de betalaínas, precursor de betalaína	23
Figura 11. Diferentes fuentes de betalaínas	24
Figura 12. Estructura de la amarantina.....	25
Figura 13. Estructura de los ácidos fenólicos	28
Figura 14. Estructura química de diferentes flavonoides	30
Figura 15. Estructura del escualeno	34
Figura 16. Esquema general de experimentación.....	39
Figura 17. Gradiente de color en columna para betalaínas	46
Figura 18. CCF para ácidos fenólicos.....	58
Figura 19. CCF para quercetina	59
Figura 20. CCF para catequina.....	60
Figura 21. CCF para rutina	61
Figura 22. CCF para esteroides.....	62
Figura 23. CCF para escualeno	63
Figura 24. CCF de fracciones colectadas en columna para purificación de amarantina.....	64
Figura 25. Fracciones con diferentes pigmentos recolectados en columna.....	65
Figura 26. Cromatograma para purificación de Fracciones 1-3	66
Figura 27. Numeración de carbonos para la molécula de amarantina	68

iii) Índice de cuadros

Cuadro 1. Diferentes nombres de quelites	12
Cuadro 2. Características botánicas de diferentes especies de <i>Amaranthus</i>	17
Cuadro 3. Caracteres considerados para la clasificación del germoplasma de amaranto.....	18
Cuadro 4. Composición nutrimental de hojas de amaranto	20
Cuadro 5. Valores reportados en la literatura de compuestos bioactivos en hojas de amaranto ...	22
Cuadro 6. Diferentes tipos de betalaínas reportadas	25
Cuadro 7. Identificación de las betacianinas presentes en la familia <i>Amaranthaceae</i>	26
Cuadro 8. Ácidos fenólicos reportados en la literatura en hojas de amaranto	29
Cuadro 9. Flavonoides presentes en la planta de amaranto reportados en la literatura.....	31
Cuadro 10. Clasificación de terpenos	33
Cuadro 11. Lípidos insaponificables presentes en la planta de amaranto reportados	34
Cuadro 12. Colectas de semillas de quelites de la familia <i>Amaranthaceae</i>	42
Cuadro 13. Condiciones de uso de RMN para amarantina	47
Cuadro 14. Condiciones HPLC amarantina.....	47
Cuadro 15. Condiciones HPLC para ácidos fenólicos	48
Cuadro 16. Gradiente para método de HPLC ácidos fenólicos	48
Cuadro 17. Condiciones de HPLC para rutina	49
Cuadro 18. Gradiente para método de HPLC de rutina	49
Cuadro 19. Condiciones de CG para escualeno	50
Cuadro 20. Programa de temperaturas para medición de escualeno en CG	50
Cuadro 21. Concentración de betalaínas y fenoles totales con diferentes métodos de secado	52
Cuadro 22. Variedades de quelites de la familia <i>Amaranthaceae</i>	53
Cuadro 23. Valores promedio de betalaínas, betacianinas, betaxantinas, clorofilas y carotenos totales para diferente colecta	54
Cuadro 24. Valores promedio de fenoles y flavonoides totales para diferentes colectas	56
Cuadro 25. Datos de ^1H y ^{13}C para amarantina.....	67
Cuadro 26. Cuantificación de amarantina para las diferentes colectas	68
Cuadro 27. Contenido de amarantina reportado en la literatura.....	69
Cuadro 28. Presencia de ácidos fenólicos en las diferentes colectas	71
Cuadro 29. Cuantificación de ácidos fenólicos para las diferentes colectas	72
Cuadro 30. Valores reportados en la literatura de ácidos fenólicos en la planta de amaranto.	73
Cuadro 31. Cuantificación de rutina en las diferentes colectas	74
Cuadro 32. Valores reportados en la literatura de rutina para la planta de amaranto.....	74
Cuadro 33. Cuantificación de escualeno en las diferentes colectas	76
Cuadro 34. Valores reportados en la literatura para escualeno	76

1. Resumen

México es uno de los centros de domesticación más importantes del mundo, a través de la historia se logró la diversificación alimentaria de muchas especies vegetales. Los quelites son parte de esta diversidad que ha proporcionado seguridad alimentaria, y por sus características de adaptabilidad a factores externos difíciles para otros tipos de cultivo fueron apreciados desde la época Prehispánica; con la llegada de los españoles su consumo se vio limitado y en el presente se utilizan sólo en ciertas zonas rurales del país. La planta de amaranto (*Amaranthus spp.*) es apreciada hoy en día principalmente por la producción del pseudocereal, el cual ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista nutritivo, el aprovechamiento industrial y con referencia al contenido de compuestos bioactivos. Esta planta también es productora de hojas comestibles, con el nombre particular de “quintoniles”, el estudio del perfil de compuestos bioactivos resulta del interés mundial por su acción benéfica a la salud. Es por eso que se podría realzar la importancia de las hojas comestibles de la planta de amaranto como alimento.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la identificación de los principales compuestos bioactivos en 8 colectas correspondientes a diferentes especies de quelites de la familia *Amaranthaceae*: *A. hybridus* L. (3 colectas), *A. cruentus* raza mexicana (2 colectas), *A. hypochondriacus* raza azteca (2 colectas) y *A. spinosus* L. (1 colecta). Posteriormente hacer la cuantificación de los compuestos de mayor interés por técnicas de HPLC (amarantina, ácidos fenólicos y rutina), y CG (escualeno).

Esto se realizó con el establecimiento del método de secado más apropiado (liofilización, secado a la sombra o secado por estufa) para la conservación de dos tipos de compuestos principales betalaínas y fenoles; el método elegido fue el secado por liofilización. La cuantificación de compuestos totales se centró en los siguientes grupos: betalaínas (0.4-1.3 mg/ g muestra seca), clorofilas (1.7-3.3 mg/ g muestra seca), carotenos (139.5-441.7 µg/ g muestra seca), fenoles (8.1-12.9 mg/ g muestra seca) y flavonoides (6.9-8.4 mg/ g muestra seca), igualmente se realizó la identificación por CCF de ácidos fenólicos, flavonoides, esteroides y escualeno.

Posterior a la determinación de compuestos totales y CCF, se realizó la cuantificación de compuestos específicos: amarantina (4.4-225.4 µg/ g muestra seca), ácidos fenólicos (47.7-1284.8 µg/ g muestra seca de diferentes ácidos), rutina (0.4-0.7 mg/ g muestra seca) y escualeno (1.7-3.0 µg/ g muestra seca). Para el establecimiento de la concentración de estos compuestos se realizó la comparación con estándares comerciales con excepción de la amarantina, de la cual se realizó una purificación y caracterizada por RMN.

La presencia de los compuestos bioactivos identificados en este trabajo tienen valores similares a los reportados en la literatura, algunas de las colectas reportadas en este trabajo podrían ser una fuente importante de ellos.

2. Introducción

Los quelites son plantas que se definen como hierba o verdura tierna comestible, fueron altamente valorados desde la época precolombina, registros en “Historia General de las Cosas de la Nueva España” (Códice Florentino) los ubica como un elemento esencial en la cultura prehispánica con importancia en la alimentación así como su uso en rituales. A partir de la llegada de los españoles se dio una disminución importante en el consumo de quelites debido a que las plantas nativas no eran aceptadas, siendo sustituidas por vegetales introducidos al continente americano. Como consecuencia de todo el proceso de aculturación en la época prehispánica, el conocimiento y uso de los alimentos nativos fue gradualmente perdido, lo que llevó a una notable baja en su consumo, incluidos los quelites en la población mexicana actual ¹.

La utilización de quelites en México continua a pesar de la variabilidad en el uso en la dieta actual, sin embargo este uso se limita muchas veces a comunidades locales donde se cultiva de manera secundaria usado cuando otros elementos de la dieta empiezan a escasear; a pesar de esto, son apreciados ya que no requieren grandes cuidados para su desarrollo agrícola y el crecimiento de la planta es relativamente rápido comparado con otros cultivos. En la cocina tradicional se incorpora en crudo, cocidos, fritos o consumido como condimento ².

Las plantas de la familia *Amaranthaceae* se encuentran ampliamente distribuidas en el territorio mexicano y su uso principal se enfoca a la producción del grano de amaranto, conocido por su alto contenido de proteínas además de su alta calidad biológica; sin embargo, también esta familia es productora de los “quintoniles” (quelites de la familia *Amaranthaceae*), los cuales son consumidos a lo largo del territorio mexicano principalmente en la zona de la Sierra Norte de Puebla y constituyen una parte importante de la dieta local ³.

Por otro lado, los compuestos bioactivos en alimentos han sido altamente estudiados en las últimas décadas, el cambio en la dieta de la humanidad donde se aprecian los alimentos con valor agregado promueven su estudio. México es un lugar de alta diversidad biológica, no obstante, los alimentos nativos han sido desplazados por alimentos introducidos limitando su consumo a regiones específicas, tal es el caso de los quelites. Estudios enfocados a los alimentos nativos de México han promovido la difusión de consumo y producción, desde la identificación botánica hasta la composición nutrimental. Sin embargo, los estudios referentes a la identificación de compuestos bioactivos presentes en ellos son limitados y escasos.

Es conocido y estudiado el efecto positivo en la salud de los diferentes grupos de compuestos bioactivos, los polifenoles son probablemente los más estudiados por su acción biológica, principalmente como antioxidantes, dentro de este grupo se encuentran los flavonoides y los ácidos fenólicos. Otro grupo importante en los compuestos bioactivos son los carotenos y clorofilas, considerados de importancia principalmente por la atribución del color que establece parámetros de calidad, aunque también son estudiados por la actividad provitamínica (para carotenos) y antioxidante.

El escualeno como compuesto independiente, se ha estudiado principalmente en los granos de amaranto, y se tiene interés en el debido a que es precursor del colesterol, y por su resistencia a la peroxidación lipídica. Por último, las betalaínas son pigmentos presentes en la familia *Amaranthaceae*, su presencia se limita a plantas del orden *Caryophyllales* (donde está incluida la familia *Amaranthaceae*) y son excluyentes de las antocianinas, la pigmentación va desde el rojo (para betacianinas) hasta amarillo (para betalaínas) y la presencia en este tipo de quelites da una mayor importancia en el estudio de la parte foliar de la planta del amaranto.

El estudio de los compuestos bioactivos en quelites de la familia *Amaranthaceae* sigue la tendencia mundial de investigación en alimentos con valor agregado, dando importancia no sólo como recurso alimenticio sino también como fuente de compuestos reportados como benéficos para la salud.

3. Marco teórico

3.1 Los quelites, plantas comestibles de México

México es uno de los centros de domesticación de plantas más importantes del mundo. Se considera que la culminación de la agricultura mesoamericana fue el agroecosistema denominado “milpa”, entendido como cultivo simultáneo de maíz, frijol y calabaza, aprovechando las características de cada planta a lo largo de todo su ciclo de manejo agrícola. Además de estas plantas principales, se pueden incluir también otras dependiendo de las características ambientales y el consumo de alimentos local; estas pueden ser domesticadas como el chile y asociadas (plantas toleradas y fomentadas en el sitio). Algunas de estas especies asociadas se encuentran en vías de domesticación, tal es el caso de los quelites.²

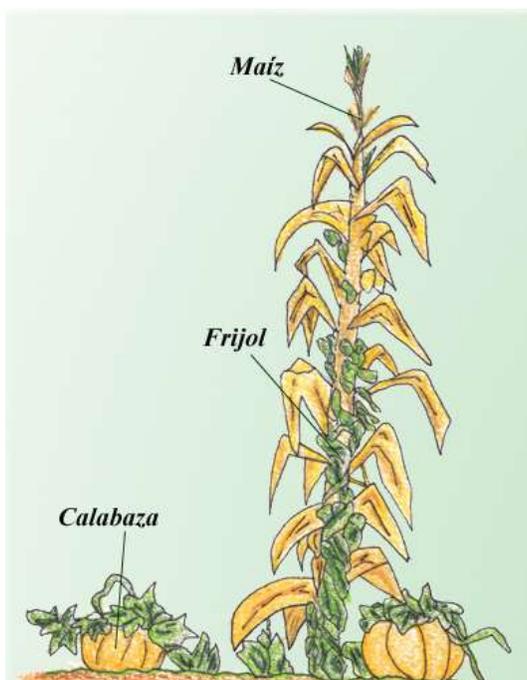


Figura 1. Estructura de la milpa⁴.

La riqueza y diversidad de alimentos consumidos por los pueblos mesoamericanos fue puesta en segundo plano desde la llegada de los españoles, es por eso que muchos de los elementos componentes de la alimentación en México se fueron perdiendo y relegando sólo a sitios locales sin tener mayor trascendencia en otros lugares.

Debido a su alto valor nutricional, su amplia adaptabilidad a condiciones ecológicas estresantes para otros tipos de cultivos y la extensa gama de formas de aprovechamiento, principalmente en

las zonas rurales, los quelites destacan dentro de un amplio conjunto de especies vegetales utilizadas desde la época Prehispánica en la alimentación humana por diferentes pueblos mesoamericanos, hoy en día tienen un papel importante en la alimentación rural.

El nombre de quelite se deriva del término náhuatl *quilitl* el cual se interpreta como hierba o verdura tierna comestible. El concepto de quelite es ampliamente usado en México e incluye hojas y tallos tiernos comestibles, junto con algunas flores ¹.

Actualmente se conocen más de 250 especies de quelites pertenecientes a diferentes familias botánicas; cerca de 89% de las hierbas comestibles pertenecen a 6 familias de dicotiledóneas: *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* y *Brassicaceae*; en las estadísticas agrícolas nacionales tienen poco significado económico tanto por la superficie cosechada como por el valor de la cosecha, sin embargo, tienen un gran valor social y alimenticio. Entre ellos destacan el quelite cenizo (*Chenopodium album*), el chipilín (*Crotalaria guatemalensis*), la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), la verdolaga (*Portulaca oleracea*), la lengua de vaca (*Sansevieria trifasciata*), y el romerito (*Suaeda calceoliformis*) ².



Figura 2. Tipos de quelites. a) quintonil rojo, b) verdolaga, c) romerito d) chipilín.

Se reporta producción de pápalo (*Porophyllum ruderale*), huazontle (*Chenopodium berlandieri*) y quintoniles (*Amaranthus spp.*) en las estadísticas agrícolas nacionales con un rendimiento promedio de 12.68, 10.91 y 9.62 ton/ha respectivamente (Figura 3) siendo el pápalo el de mayor producción y el que menos fluctuaciones ha tenido a lo largo del periodo reportado y representa el total de la producción del 2003 al 2013 ⁵.



Figura 3. Datos estadísticos de la producción de quelites en México durante el periodo 2003-2013 ⁵.

3.1.1 Etnobotánica de los quelites

El estudio de las plantas utilizadas como alimento por las poblaciones antiguas se hace a partir de materiales botánicos que se recuperan de los sedimentos de excavaciones arqueológicas de diferentes zonas de la cuenca de México (Figura 4).

Cuadro 1. Diferentes nombres de quelites ⁶.

Nombre S. XVI	Nombre popular	Nombre científico
uauhzontli	huazontle	<i>Chenopodium berlandieri</i>
itzmiquilitl	verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i>
iztaquilitl	romerito	<i>Suaeda calceoliformis</i>
epaçotl	epazote	<i>Dysphania ambrosioides</i>
papaloquilitl	pápalo	<i>Porophyllum ruderale</i>

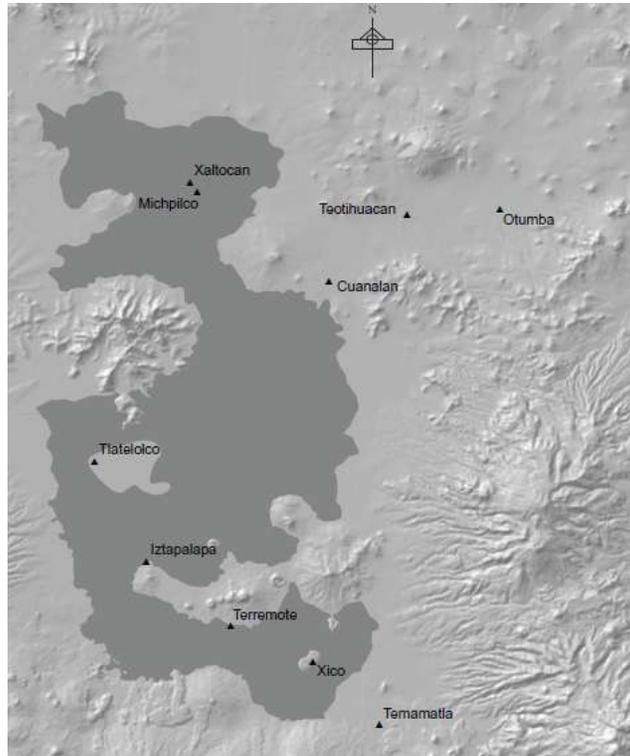


Figura 4. Localización de los sitios arqueológicos estudiados en la cuenca de México ⁶.

Los materiales encontrados se dividen en: macroscópicos (semillas, frutos y madera carbonizada) y microscópicos (polen, fitolitos y gránulos de almidón). Una de las fuentes más importantes de información sobre los recursos y la alimentación de las comunidades indígenas del centro de México es la obra titulada “Historia general de las cosas de la Nueva España” también conocida como Códice Florentino, en esta obra describen las plantas comestibles dividiéndolas en cocidas, crudas y condimento ⁶.

- Hierbas cocidas, hay evidencias botánicas arqueológicas de amaranto, se menciona que sus hojas (*uauhquilitl*) se comían cocidas, con ellas se podía hacer tamales (*quiltamalli*) y tortillas de maíz molido mezclado con hojas (*quillaxcalli*). También se consumía el huazontle cuyas hojas eran comidas cuando estaban tiernas, se cocían y se exprimía el agua. Otra hierba que se consumía era la verdolaga recuperada en varios sitios arqueológicos.
- Hierbas crudas, el romerito ha sido encontrado en los sitios de Xaltocan, Michpilco y Cuanalan en la Cuenca de México se describe como una planta pequeña y salada. En Xaltocan, Iztapalapa, Otumba y Cuanalan se recuperaron semillas de cola de zorro que ha sido considerada por algunos autores como el primer cereal importante en América.
- Condimento, destaca principalmente el epazote presente en las zonas de Xaltocan, Iztapalapa, Cuanalan y Temamatla, se describe como una hierba muy olorosa y principal uso en salsas y con propiedades medicinales.



Figura 5. Quelites: *izquimilitl*, *quiltonilli*, *aixochiquilitl* ⁶.

3.1.2 Formas de consumo de quelites

Los quelites forman parte de la llamada dieta complementaria, que junto con la dieta básica, conforman el patrón alimenticio de gran parte de la población mexicana (aunque en muchas ocasiones llegan a constituir el plato fuerte de la comida tradicional), actualmente en México son consumidos por numerosos grupos étnicos en todas las regiones del país.

El consumo de las hojas y tallos tiernos se da durante la etapa vegetativa de la planta hasta el momento de la floración, se hace el corte para el consumo cuando se presenta una inflorescencia inmadura de 2 cm, misma que se retira al momento de prepararlos para su ingesta ⁷.

Las formas de preparar los quelites son variadas y puede darse la combinación de dos o más de ellas en ciertas especies

- En crudo, no se hace preparación, las plantas se consumen directamente.
- Hervidos, los quelites se ponen en agua hirviendo por determinado tiempo.
- Fritos, se cocinan en aceite hirviendo o en manteca.
- Al vapor o asados, se cuecen en su propio jugo ya sea sobre un comal o dentro de un recipiente tapado.

Los quelites se combinan con sopas, tacos, quesadillas, pinole o esquites. En algunos platillos constituyen el componente principal, pero también puede ser el condimento que proporciona diferentes sabores y aromas ⁸.



Figura 6. Formas de cocinado de quelites. a) verdolagas con carne, b) romeritos con mole, c) tamal de chipilín.

En ocasiones, más que como alimento, los quelites son usados como condimento o como sustituto del tomate o jitomate, tal es el caso del pápaloquelite, del cilantro (*Coriandrum sativum*) y de los xocoyolis (*Begonia* spp.)

En el caso del consumo de quintoniles en la Sierra Norte de Puebla, no se mezclan el quintonil rojo (*A. hypochondriacus* L.) y el quintonil blanco (*A. cruentus* L.), algunas veces son combinados con otro quelite cuando alguno de ellos escasea, como en el caso del quintonil blanco que se combina con la verdolaga en un guiso que lleva salsa verde y carne de cerdo. Es más apreciado el quintonil blanco pues se considera menos agresivo para el cultivo. Ambas especies son utilizadas también como forraje para ganado porcino y aves de corral ³.

3.2 Quelites de la familia *Amaranthaceae*

El grupo de plantas pertenecientes al género *Amaranthus* spp. incluye ciertas especies de quelites, además de proporcionar semillas para su uso como pseudocereal se producen hojas comestibles, las cuales son llamadas con el término “quintoniles” ⁷.

El estudio del amaranto como planta productora de grano es amplio, sin embargo ha sido poco estudiado como planta productora de verdura ⁹. Dentro de las especies más comunes que existen en México se encuentran: *A. hybridus*, *A. spinosus*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, de las cuales existen diferentes razas; La distribución y el consumo son amplios en el territorio nacional con reportes de presencia principalmente en la zona centro sur de México dentro de la zona

biogeográfica del Eje Volcánico Transmexicano en los estados de Puebla, Morelos, Tlaxcala, Oaxaca, México y Ciudad de México así como en la región biogeográfica de la Sierra Madre del Sur, su uso se da entre numerosos pueblos indígenas, principalmente en la Sierra Norte de Puebla ^{8,10}.

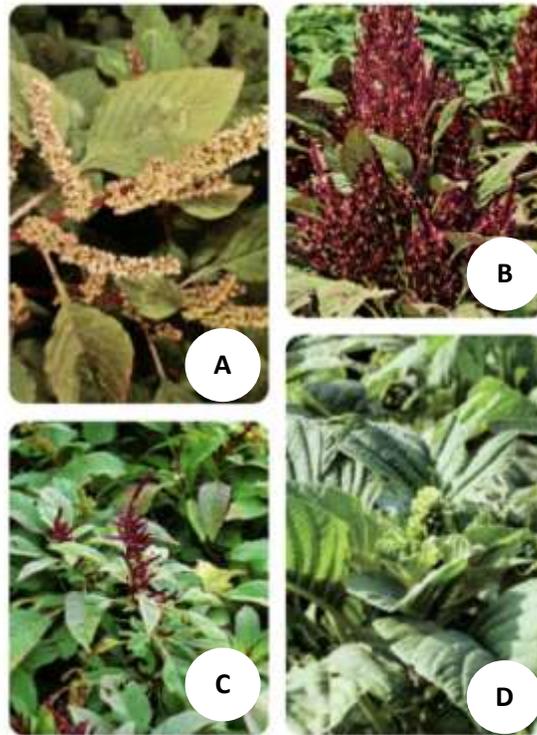


Figura 7. Quelites de la familia *Amaranthaceae*. a) *A. spinosus*, b) *A. hypochondriacus*, c) *A. hybridus*, d) *A. cruentus* ¹¹.

3.2.1 Taxonomía y características botánicas del género *Amaranthus*

La familia *Amaranthaceae* comprende alrededor de 70 géneros y cerca de 800 especies de hierbas anuales de origen tropical, que se adaptan bien a climas templados. Ha evolucionado en regiones cálidas, secas y con suelos salinos, lo que da como resultado adaptaciones anatómicas y fisiológicas especiales.

El género *Amaranthus* comprende hierbas anuales (muy rara vez perennes), monoicas, dioicas o polígamas, a continuación se presentan las características botánicas generales de la planta ¹⁰.

- * Tallos postrados, erectos, ascendentes o infrecuentemente decumbentes, simples a muy ramificados, glabros a vilosos, tricomas pluricelulares, blanquecinos o amarillentos, simples o espiralados.
- * Hojas alternas, rara vez un par de espinas presentes en la base de las hojas, coriáceas a membranáceas, a veces suculentas, (venas muy notorias en el envés, blanquecinas a amarillentas), glabras, vilosas o vilosas-glandulares en el envés, margen entero a ligeramente sinuado, base redondeada a deltoide y/o atenuada, a veces asimétricas, sésiles a pecioladas.
- * Inflorescencias de tipo espigas (simples o compuestas), racimos o panículas de espigas (flores congestionadas hacia el ápice); axilares y/o terminales (las terminales alargadas y las axilares generalmente en pequeños glomérulos o ambas).
- * Raquis primarios viloso, viloso-glandular a glabro, generalmente sésil o pedunculado. Raquis secundarios vilosos, viloso-glandulares a glabro, sésiles. Raquis terciarios rara vez presentes.

En el Cuadro 2 se observan las características botánicas para determinadas especies de la planta de amaranto

Cuadro 2. Características botánicas de diferentes especies de *Amaranthus*¹⁰.

Especie/ Característica botánica	<i>A. hypochondriacus L.</i>	<i>A. cruentus L.</i>	<i>A. hybridus L.</i>
Altura	Hasta 3m de altura	Hasta 2m de altura	Hasta 2.5m de altura
Hojas	Ovaladas u ovado-oblongas Ápice agudo o acuminado Base cuneada o aguda	Elípticas rombo- ovatinadas u ovato- lanceoladas Ápice agudo obtuso o acuminado Base cuneada o aguda	Muy variables: ovadas, lanceoladas, elípticas rómicas etc.
Inflorescencia	Gran tamaño Con espigas y panículas laterales Densa erecta y espinosa	Espigas suaves y laxas Panículas en la parte superior	Laxa Con muchas espigas laterales
Flor	Presenta 5 tépalos Ligeramente curvados Más largos que en otras especies	Presentan 5 tépalos Rectos, oblongos u oblongos- obovatinados	Tépalos pequeños Ligeramente curvados
Semillas	Coloración blanca, dorado, café y negro	Coloración blanca, amarilla marrón o negra	Coloración oscura

El germoplasma de amaranto disponible en la actualidad muestra una gran diversidad morfológica, producto de un alto grado de cruzamiento y de múltiples criterios de selección por parte de los agricultores. La clasificación dentro del género *Amaranthus* ha sido difícil debido a que las características usadas muestran una alta segregación dentro de las poblaciones. Dentro de los descriptores usados para la caracterización y evaluación del germoplasma del amaranto se consideran tanto la producción de grano como de verdura. La caracterización es el registro de caracteres altamente heredables de una planta, que pueden ser distinguidos a simple vista y que se expresan en todos los ambientes ¹².

La región de la Sierra Norte de Puebla ha sido una de las regiones donde el uso del amaranto como verdura ha tenido un papel muy importante y presenta una gran diversidad morfológica y una fuerte hibridación, dentro de las características que se toman en cuenta para su clasificación están

Cuadro 3. Caracteres considerados para la clasificación del germoplasma de amaranto ¹².

Durante la floración	Después de la floración	Durante la madurez
Color: tallo, hojas e inflorescencias	Diámetro: tallo	Longitud y diámetro: inflorescencia
Forma: hojas e inflorescencia	Longitud y Ancho: hoja	Color: semilla
Densidad: inflorescencia y ramificación lateral		Altura total: planta

3.2.2 Diversidad de quintoniles en la Sierra Norte de Puebla

En la zona de la Sierra Norte de Puebla se lleva a cabo un proceso muy activo de domesticación del amaranto como verdura, es por eso que la identificación taxonómica se vuelve complicada, el modo de siembra de las plantas usadas como quelite pueden darse de 3 maneras principalmente¹³:

- Cultivada. Son aquellas plantas que durante su ciclo de vida reciben manejo y cuidado por parte del ser humano. Se debe puntualizar que, las plantas domesticadas son cultivadas, pero no todas las cultivadas son domesticadas.
- Fomentadas o inducidas. El tipo de manejo consiste en diferentes estrategias dirigidas a incrementar la densidad de población de las plantas útiles en sus hábitats naturales. Incluye la siembra de semillas o la propagación intencional de estructuras vegetativas en los mismos lugares ocupados por las poblaciones de plantas silvestres o arvenses.

- Arvenses y Ruderales. Se define una planta como “maleza” cuando su población se desarrolla en situaciones con un fuerte grado de estrés causado por el hombre. Incluye por una parte, las especies llamadas “agrestes” o arvenses que entran a los campos de cultivo y, por otro, lado están las “ruderales”, que pueden encontrarse en sitios con vegetación perturbada o a lo largo de los caminos. Sin embargo, no es posible establecer una línea entre estos dos tipos de maleza, ya que una especie puede ocupar ambos hábitats.

La manera en que se da esta manipulación de las plantas es para la mejora o estímulo de crecimiento, esta interacción constante entre especies para el aumento intencionado de densidad de la población de plantas útiles incluye siembra de semillas específicas o propagación intencional de ciertas especies.

Este tipo de variantes en el manejo de las plantas de quelites provoca que ciertas especies puedan presentar características botánicas y composicionales “mezcladas” sin tener que cambiar de especie y/o variedad, a continuación se muestra la gran variedad de características físicas presentes en las hojas de amaranto.



Figura 8. Variedad de hojas en el género *Amaranthus* ¹¹.

3.2.3 Composición nutrimental

La planta de amaranto es un cultivo importante en su uso como verdura y semilla con alto valor nutricional, generalmente se utiliza como fuente importante de nutrientes en países en vías de desarrollo debido a que representan una forma económica y de fácil obtención de alimento. A continuación se presenta la composición nutrimental reportada en diferentes estudios.

Cuadro 4. Composición nutrimental de hojas de amaranto

Especie	Humedad (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Fibra (%)	Carbohidratos disponibles (%)	Referencia
<i>A. hybridus</i> L.	83.48	17.92 ^a	4.65 ^a	8.61 ^a	52.18 ^a	Akubugwo y col. ¹⁴
<i>A. cruentus</i>	72.93	4.46	3.0	10.4	10.4	Kwenin y col. ¹⁵
<i>Amaranthus spp.</i> (AV-35)	81.35	2.49 ^b	-	72.5 ^c	-	Shukla y col. ¹⁶

^a % peso seco, ^b g/ 100 g peso fresco, ^c mg/ g peso fresco

Se reconoce a la planta de amaranto como una fuente importante de proteína equilibrada respecto a la composición de aminoácidos en especial la parte de la semilla, estudios indican que la calidad nutricional de las semillas de los amarantos cultivados es mejor que en muchos cereales, se presentan mayores niveles de treonina, arginina, triptofano y lisina comparado con otros cereales¹⁷.

- Otros compuestos estudiados

El estudio de otros compuestos presentes en las hojas de amaranto se reportan para fitatos, taninos y oxalatos. Los fitatos pueden provocar una mala absorción de minerales y aminoácidos como la niacina debido a su naturaleza quelante, es reportado una concentración en un rango de 0.52-0.61% presente en especies de *A. hybridus*, *hypochondriacus* y *cruentus*. El efecto de los taninos puede afectar el crecimiento de los animales pues evitan su consumo por la característica de astringencia al paladar, se reporta un contenido de 0.043-0.116% de equivalentes de catequina presente en especies de *A. hybridus*, *hypochondriacus* y *cruentus*¹⁸.

El contenido de oxalatos se monitorea por la formación del oxalato de calcio con la presencia de iones calcio, provocando su precipitación obstaculizando los conductos renales, se reporta el contenido de 3-16.5 g/kg en hojas de diferentes cultivos de amaranto y en una cantidad de 0.6-0.11% de ácido oxálico en la parte foliar de 10 cultivos de amaranto^{16,19}.

3.3 Compuestos bioactivos

La definición de compuesto bioactivo de acuerdo a Biesalski y col., en el 2009²⁰ se establece como los compuestos esenciales y no esenciales que están presentes en la naturaleza y son parte de la cadena alimenticia, que se ha probado que tienen un efecto positivo en la salud humana.

La clasificación establecida en Dillard y German en el 2000²¹ identifica 4 clases principales de compuestos bioactivos presentes en las plantas: terpenoides, metabolitos fenólicos, alcaloides y otros compuestos con nitrógeno. Los terpenoides incluyen monoterpenos, iridoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, saponinas, fitoesteroles, carotenos, entre otros. Dentro de los metabolitos fenólicos se encuentran antocianinas, benzofuranos, cumarinas, flavonoides, flavononas, flavonoles, isoflavonoides, lignanos, ácidos fenólicos, estilbenoides, taninos, xantonas, etc. Los alcaloides incluyen betalaínas, índoles, quinolinas, isoquinolinas, pirrolidina, entre otros. Finalmente los compuestos con nitrógeno encuentran glucosidos cianogénicos, glucosinolatos, purinas y pirimidinas. Es importante puntualizar que se establecen dosis predeterminadas para algunos de los compuestos mencionados en la clasificación. A continuación se presentan los principales compuestos bioactivos presentes en quelites de la familia *Amaranthaceae* y los valores de concentración reportados en la literatura.

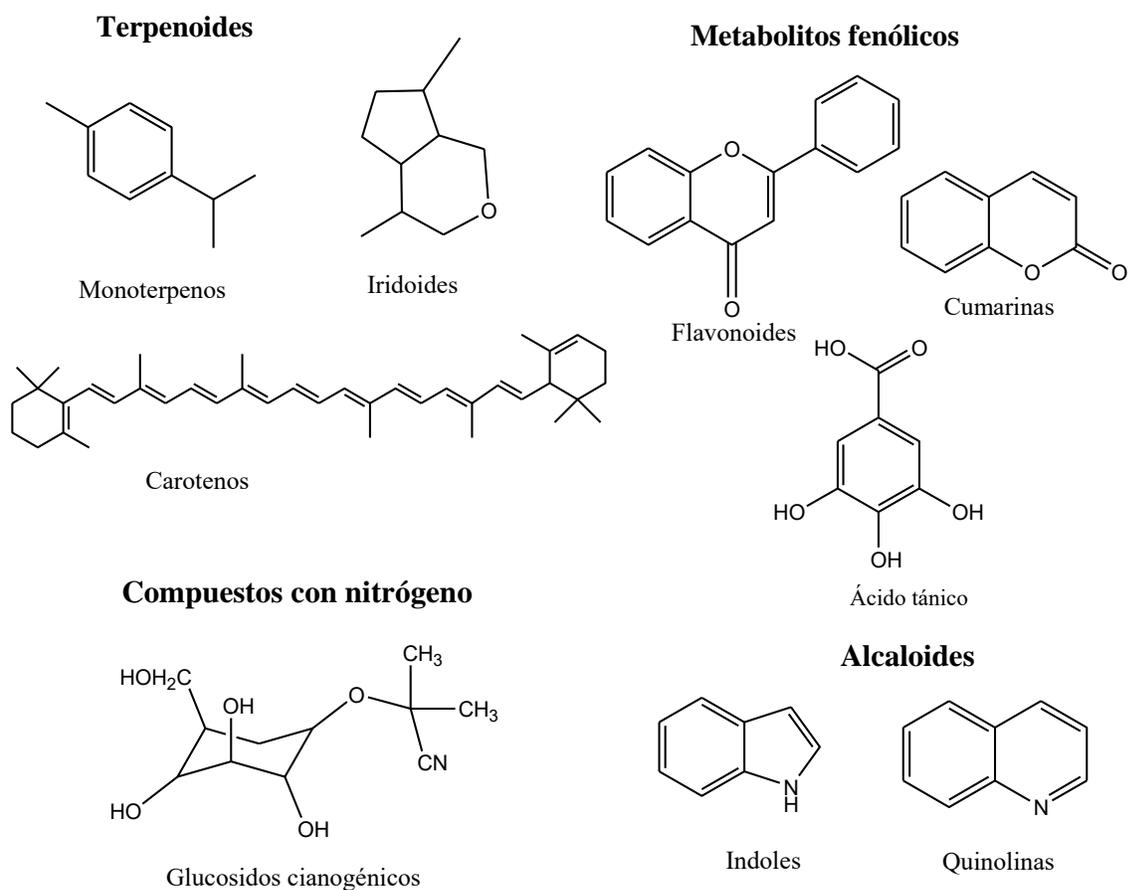


Figura 9. Estructuras químicas de compuestos bioactivos

Cuadro 5. Valores reportados en la literatura de compuestos bioactivos totales en hojas de amaranto

Espece de amaranto	Betaláinas totales (ng/ g PF ^a)	Clorofilas totales (µg/g PF ^a)	Carotenos totales (µg/g PF ^a)	Flavonoides totales (µg/g PF ^a)	Fenoles totales (µg/g PF ^a)	Referencia
A. <i>hypochondriacus</i> raza nueva azteca	592.3 ± 81.9	500 ± 0.09	50 ± 0.0	77.7 ± 10.6	158.1 ± 10.6	Khanam y Oba, 2013 ²²
A. <i>hypochondriacus</i> raza línea mexicana	557.5 ± 122.4	480 ± 0.6	50 ± 0.0	62.6 ± 5.8	115.8 ± 2.2	Khanam y Oba, 2013 ²²
A. <i>tricolor</i> raza Alto pati	1127.9 ± 85.3	710 ± 1.5	90 ± 0.3	53.6 ± 4.5	133.4 ± 7.6	Khanam y Oba, 2013 ²²
A. <i>tricolor</i> raza Baromashi	997.9 ± 112.8	570 ± 0.8	60 ± 0.1	64.6 ± 7.5	143.9 ± 4.5	Khanam y Oba, 2013 ²²
A. <i>hypochondriacus</i>	16.90 ± 2.17 ^b	-	-	11.40 ± 0.17 ^c	14.94 ± 0.32 ^d	Hongyan y col. 2015 ²³
A. <i>caudatus</i>	20.93 ± 1.82 ^b	-	-	6.51 ± 0.09 ^c	10.47 ± 0.36 ^d	Hongyan y col. 2015 ²³

^a PF: peso fresco, ^b µg/ 100g peso seco, ^c mg catequina /g peso seco, ^d mg ác. gálico/g peso seco

3.3.1 Betalaínas

- **Características químicas**

Las betalaínas son pigmentos nitrogenados solubles en agua, son derivados de imonio del ácido betalámico, es el cromóforo presente en todas las estructuras de betalaínas (Figura 10a); el tipo de adición al residuo del ácido betalámico determinará la clasificación de la betalaína. De acuerdo a su estructura química se dividen en betacianinas (color rojo-violeta) y betaxantinas (amarillo) ²⁴. Ambos grupos de moléculas son ópticamente activas ya que poseen dos centros quirales en C-2 y C-15. La hidrólisis de la betacianina produce la betanidina o el epímero en C-15 isobetanina o una mezcla de las dos agliconas ²⁵.

Las betacianinas, del latín beta: raíz y griego *cyaneos*: azul (Figura 10b), son el resultado de la condensación del ácido betalámico con un residuo del ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA), la condensación del ácido betalámico (Figura 10a) con la estructura fenólica del ciclo-DOPA extiende la resonancia electrónica dando una absorbancia máxima de 535-540 nm. La betanidina (Figura 10b) es el aglicón de la mayoría de las betacianinas, el patrón de coloración dependerá de los diferentes tipos de sustitución (glicosilación y acilación) en el ciclo-DOPA en las posiciones 5 o 6 de la betanidina resulta en las diferentes estructuras de las betacianinas ^{24,26}.

Las betaxantinas, del latín beta: raíz y el griego *xanthos*: amarillo (Figura 10c), son productos de condensación del ácido betalámico y aminoácidos o aminas. Dependiendo de la estructura del compuesto al que se una el ácido betalámico es el máximo de absorción que está entre 460 y 480nm. Las betaxantinas más estudiadas son la glutamin-betaxantina (vulgaxantina) en el betabel (*Beta vulgaris* L.) e indicaxantina (betaxantina-prolina) que es el pigmento predominante en las tunas amarillas de nopal (*Opuntia* ssp.) ²⁶.

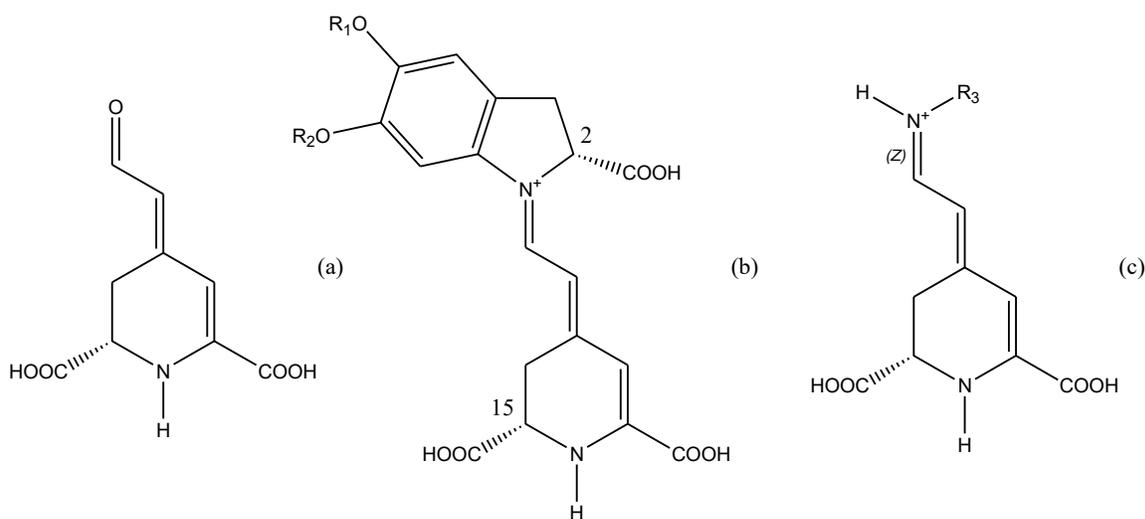


Figura 10. Estructura de betalaínas, precursor de betalaína. (a) ácido betalámico, (b) betacianina, R1=R2=H betanidina, R1= β-glucosa R2= H betanina, (c) betaxantina R3= amina o aminoácido ²⁴.

- **Fuentes de betaláinas**

Una de las principales características de las betaláinas es que su presencia se limita exclusivamente al orden *Caryophyllales*, dentro de este orden se encuentran las familias: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Holophytaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaceae* y *Portulacaceae*. Otra característica importante de este grupo de compuestos es que la presencia de betaláinas y antocianinas en la misma planta son mutuamente excluyentes, no se ha reportado hasta el momento la presencia de ambos compuestos en una misma planta ^{27,28}.

La fuente de betaláinas más conocida es el betabel (*Beta vulgaris* L.), el cual contiene dos de los pigmentos más conocidos: betanina (una betacianina) y la vulgaxantina I (una betaxantina). Otras fuentes conocidas de betaláinas son las plantas de género *Amaranthus* de las cuales se conocen más de 60 especies, se utiliza como planta productora de grano y hojas comestibles así como planta ornamental y de forraje. La tuna (*Opuntia spp.*) muestra una gran variedad de coloraciones dependiendo de la especie, lo que indica una mezcla en diferentes proporciones de betacianinas con betaxantinas. La pitaya roja o fruto del dragón (*Hylocereus polyrhizus*) conocido por su color morado intenso y pequeñas semillas, presenta alto contenido de betacianinas como betanina, filocactina, hilocerenina y sus isómeros ²⁹.



Figura 11. Diferentes fuentes de betaláinas. a) betabel, b) pitaya roja, c) tuna roja, d) amaranto ²⁹.

A continuación se presentan diferentes ejemplos de betalaínas reportadas en los diversos recursos vegetales como fuentes de betacianinas y betaxantinas

Cuadro 6. Diferentes tipos de betalaínas reportadas ³⁰.

Grupo	Tipo	Nombre	Fuente
Betacianina	Betanina	Filocactina	Cactus de Navidad (<i>Schlumbergera buckleyi</i>)
		Hilocerenina	Pitaya de Costa Rica (<i>Hylocereus costaricensis</i>)
	Amarantina	Iresinina	Amaranto plumoso (<i>Celosia argentea</i> var. <i>Plumosa</i>)
		Gomferenina	Gomferenina I
Betaxantina	Derivado de aminoácidos	Portulacaxantina II	Portulaca/ flor de seda (<i>Portulaca grandiflora</i>)
		Triptofano-betaxantina	Amaranto globoso (<i>Gomphrena globosa</i>)
	Derivado de amina	Miraxantina V	Amaranto plumoso (<i>Celosia argentea</i> var. <i>Plumosa</i>)

El tipo de betalaína más representativa en la familia *Amaranthaceae* es la amarantina (betanidina 5-O-β-glucuronosilglucosido), es una mezcla de ácido glucurónico, glucosa y dos tipos de aglicón: betanidina e isobetanidina (por el epímero en C-15) conocidos como amarantina e isoamarantina. La proporción de amarantina e isoamarantina puede variar dependiendo de la especie, es reportado que en hojas de *A. cruentus* el porcentaje de amarantina es del 82% mientras que el de isoamarantina es de sólo el 18%. El glucósido amarantina es soluble en agua y alcohol acuoso, con una absorción máxima a 535-537 nm, con fórmula empírica C₃₀H₃₅N₂O₁₉ con un peso molecular de 727Da ³¹.

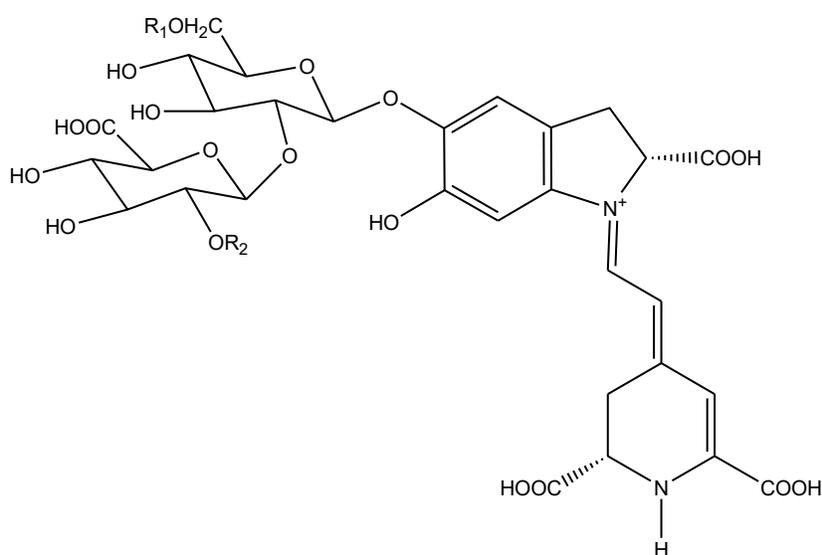


Figura 12. Estructura de la amarantina (R1=R2=H) ³¹.

- **Presencia de betalaínas en la familia *Amaranthaceae***

La identificación del tipo de betacianinas presentes en diferentes especies de la familia *Amaranthaceae* fue reportado en Cai y col. en el 2001³² a través del perfil de HPLC-MS. A continuación se presenta el perfil cromatográfico del tipo de betacianinas encontradas

Cuadro 7. Identificación de las betacianinas presentes en la familia *Amaranthaceae* en el orden de elución de acuerdo al tiempo de retención³².

Pico	Nombre	Tiempo de retención (min)	[M + H] ⁺
1	Amarantina	10.71	727
1'	Isoamarantina	12.01	
2	Betanina	14.77	551
2'	Isobetanina	16.66	
3	Iresinina I	17.49	871
3'	Isoiresinina I	18.37	
4	Celosianina I	19.90	872
4'	Isocelosianina I	20.56	
5	Celosianina II	21.32	903
5'	Isocelosianina II	22.11	
6	Gomferenina I	32.83	551
6'	Isogomferenina I	35.19	
7	Gomferenina II	58.34	697
7'	Isogomferenina II	59.10	
8	Gomferenina III	61.58	727
8'	Isogomferenina III	63.59	

El contenido promedio de amarantina e isoamarantina entre 40 genotipos de 37 especies en 8 géneros expresado en porcentaje total de área de pico fue de 91.5 y 2.8% respectivamente indicando que son las betacianinas predominantes en esta familia.

- **Propiedades biológicas de las betalaínas**

En los últimos años, las betalaínas han mostrado potencial como compuesto bioactivo importante. A continuación se muestran los estudios en relación a beneficios a la salud que se han reportado:

- * **Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de las betalaínas se ha demostrado en diversos estudios químicos y biológicos, estudios como capacidad antioxidante con equivalente TROLOX, ensayo de DPPH, y ensayo de ABTS, se ha demostrado que los extractos de betacianinas de betabel generan una acción inhibitoria de radicales libres. El ácido betalámico es la estructura más simple relacionada con las betalaínas, se considera como la unidad bioactiva básica de estas moléculas, se ha estudiado que la capacidad antioxidante aumenta con la conexión de la estructura resonante característica de esta betalaína con estructuras como los anillos aromáticos³³. Se ha encontrado

que las betalaínas de tuna inhiben la peroxidación lipídica y hemo-descomposición a bajas concentraciones²⁹. Por parte de los experimentos de biodisponibilidad (definido como la cantidad de sustancia activa absorbida después de la administración oral) se han estudiado extractos de betabel y tuna, mostrando que tanto el tipo de betalaína como la matriz alimenticia afectan la biodisponibilidad, estudios *in vitro* de digestión de betalaínas mostraron que la indicaxantina es más resistente que la betanina al ambiente fisiológico así como las enzimas gastrointestinales, es posible que existan vías de excreción diferentes a la renal^{34,35}.

* Propiedades anticancerígenas

Debido a la acción inhibitoria de radicales libres de las betalaínas, como consecuencia, estas moléculas pueden prevenir enfermedades cardiovasculares y cáncer. Se ha estudiado que las betalaínas tienen la capacidad de inducir la producción de la enzima quinona-reductasa en experimentos *in vivo* en ratas, esta enzima cumple funciones desintoxicantes asociadas a la prevención del cáncer³⁶. También las betalaínas provenientes de la tuna han mostrado actividad antiproliferante de células cancerígenas, por otro lado, se ha encontrado que la betanina induce la apoptosis independientemente de la dosis y el tiempo en una línea de leucemia humana mieloide crónica (K-562)^{29 33}.

* Efecto antilipidémico y antimicrobiano

Los extractos de plantas con betalaínas pueden usarse para disminuir los niveles de lípidos debido a que son libres de efectos secundarios y no tóxicos. Se ha reportado que las betalaínas inhiben la mieloperoxidasa y oxidación lipoprotéica promovida por nitratos por la inhibición de radicales lipoperoxilos²⁹. En un estudio publicado por Coloaco e Clemente y Desai en el 2011³⁷ utilizaron extractos de *A. tricolor* con contenido de betalaínas en ratas diabéticas, se mostró una reducción del colesterol en sangre, en los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL por las siglas en inglés), además del aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). También se ha reportado que las betalaínas tienen efecto antimalaria y antimicrobiano en extractos de *Amaranthus spinosus* y *Opuntia matudae*²⁹.

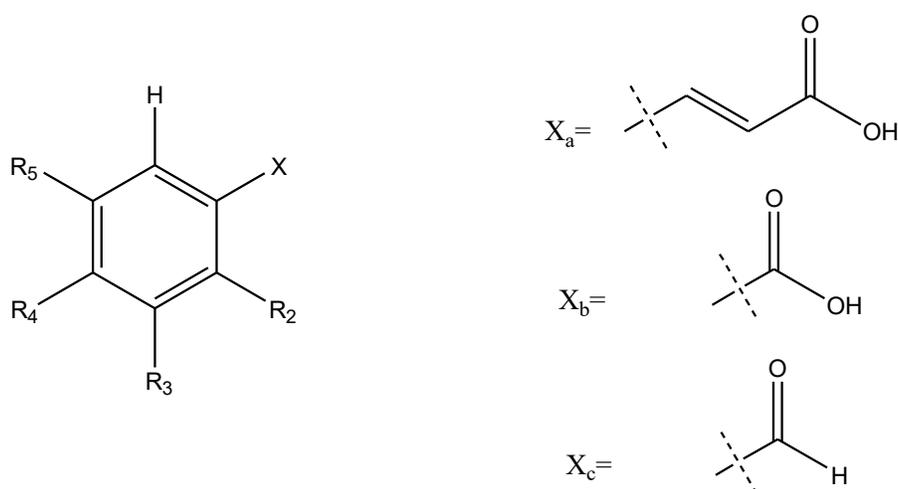
3.3.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios encontrados en las plantas. Se tiene gran diversidad de estructuras incluyendo moléculas simples, como los ácidos fenólicos, y los polifenoles entre los que se encuentran estilbenos, flavonoides y polímeros. Comúnmente se utiliza el término polifenol como compuesto fenólico, sin embargo, este término sólo aplica para los compuestos que tengan al menos dos anillos fenólicos³⁸. A continuación se describen los compuestos fenólicos de principal interés en la familia *Amaranthaceae*.

3.3.2.1 Ácidos fenólicos

- **Características químicas**

Los ácidos fenólicos se refieren al grupo de compuestos que poseen funcionalidad de ácidos carboxílicos, están constituidos por dos estructuras de carbono características en la Figura 13 se presentan 3 tipos de estructuras, a) tipo hidroxicinámico (X_a) b) tipo hidroxibenzóico (X_b) donde el esqueleto básico se mantiene del mismo modo, sin embargo, el número y posiciones de los grupos hidroxilo en el anillo aromático establece cierta variedad en las estructuras y c) análogos aldehídos (X_c), ejemplos como ácido caféico, vainillínico, ferúlico y protocatecoico están presentes frecuentemente en las plantas ³⁹.



R_2	R_3	R_4	R_5	X	Nombre común
H	-OCH ₃	-OH	H	a	Ácido ferúlico
H	-OH	-OH	H	a	Ácido caféico
H	H	H	H	b	Ácido benzóico
H	H	-OH	H	b	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
-OH	-OH	-OH	-OH	b	Ácido gálico
H	-OCH ₃	-OH	H	c	Vainillina

Figura 13. Estructura de los ácidos fenólicos ³⁹.

- **Fuentes de ácidos fenólicos**

El contenido de ácidos hidroxibenzóicos en las plantas comestibles, es en general muy bajo, con la excepción de algunos frutos rojos, el rábano negro, y las cebollas que pueden contener varios miligramos por kilogramo de peso fresco. El té verde es una fuente importante de ácido gálico, pudiendo contener más de 4.4 g/kg de peso fresco. Además, los ácidos hidroxibenzóicos son componentes de complejas estructuras como los taninos hidrolizables (galotaninos en mangos y elagitaninos en frutos rojos como fresas, moras azules y rojas).

Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes (principalmente caféico, ferúlico y sinápico), generalmente se encuentran en forma ligada, aunque pueden ser liberados por tratamientos como congelamiento o fermentación. El ácido caféico es generalmente el ácido más abundante en la mayoría de las frutas, existen cantidades importantes en el kiwi. El ácido ferúlico es el ácido más abundante encontrado en los granos, presente principalmente en la aleurona y en el pericarpio los cuales contienen un 98% del total de ácido ferúlico, harina de arroz y avena contienen aproximadamente 63 mg/kg sin embargo harina de maíz es reportado un contenido tres veces mayor⁴⁰.

- **Presencia de ácidos fenólicos en la familia *Amaranthaceae***

Existe una gran diversidad de ácidos fenólicos reportados en hojas de amaranto, en el Cuadro 8, se muestran los tipos de ácidos fenólicos presentes en algunas especies de amaranto.

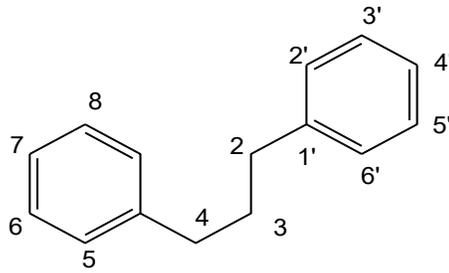
Cuadro 8. Ácidos fenólicos reportados en la literatura en hojas de amaranto

Especie de <i>Amaranthus spp.</i>	Ácidos reportados	Referencia
<i>A. hypochondriacus</i> raza nueva azteca	Gálico, vainillinico, siringico, salicílico, elágico, caféico, clorogénico, cumárico, sinápico, cinámico	Khanam y Oba, 2013 ²²
<i>A. caudatus</i>	Gálico, protocatecoico, clorogénico, 2,4-dihidroxibenzóico, ferúlico, salicílico	Hongyan y col. 2015 ²³
<i>A. caudatus</i> (semilla)	Caféico, ferúlico, cumárico, benzóico, vainillinico	Repo-Carrasco-Valencia y col. 2010 ⁴¹

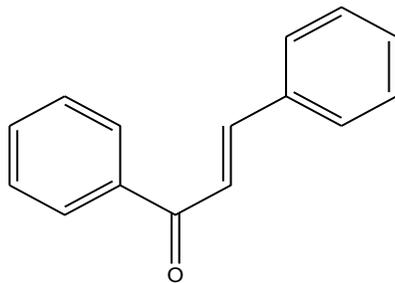
3.3.2.2 Flavonoides

- **Características químicas**

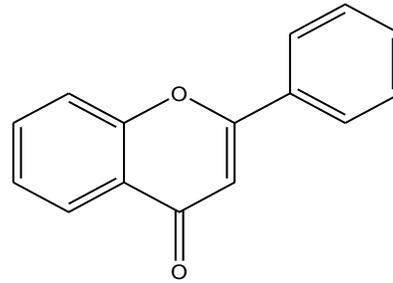
Los flavonoides están clasificados como polifenoles y cuentan con un esqueleto de difenilpropano (C₆ C₃ C₆) Dentro de esta familia se incluyen los flavanoles, flavanonas, antocianidinas, flavonas y flavonoles. Las diferencias estructurales con cada grupo se dan por la diferencia entre el número y arreglos de los grupos hidroxilo así como la forma de acilación y glicosidación. Las flavonas y flavonoles más abundantes son las que están hidroxiladas en las posiciones 3' y 4' del anillo B, en los flavonoides la posición más común de glicosidación es en los carbonos 3 y 7 (aunque menos frecuente). La glucosa es el residuo de azúcar más frecuente, aunque también puede haber sustituciones con galactosa, ramnosa y xilosa⁴².



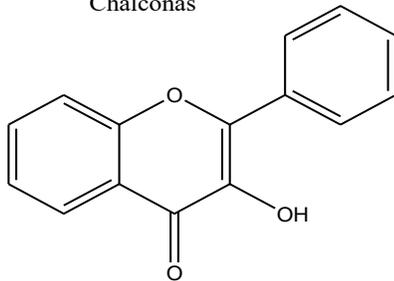
Estructura básica de un flavonoide



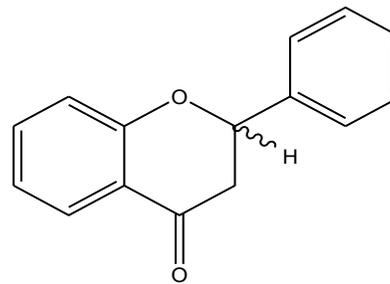
Chalconas



Flavonas



Flavonoles



Flavanonas

Figura 14. Estructura química de diferentes flavonoides

- **Fuentes de flavonoides**

El alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) se reportó como la mayor fuente de rutina, la parte aérea de la planta (hojas y flores) contiene aproximadamente de 2 a 10% del peso seco. Se reportan más de 70 especies con contenido importante de rutina entre las que se encuentran, ruda (*Ruta graveolens* L.), sófora (*Sophora japonica* L.), maranta (*Maranta leuconeura* E.), también se ha podido extraer un 1.5% de rutina a partir de extracto de hojas de tabaco. La catequina se encuentra en muchos tipos de frutos, el durazno (*Prunus armeniaca*) es de las fuentes más abundantes con 250 mg/kg de peso fresco, también están presentes en el vino tinto (300 mg/L) también el té verde y el chocolate son fuentes importantes. La fuente más representativa de quercetina es la cebolla distribuida principalmente en la zona externa (piel y aros) en una cantidad aproximada de 2604 mg/kg de muestra seca^{40,43,44}.

- **Presencia de flavonoides en la familia *Amaranthaceae***

Existen diversos estudios que reportan la diversidad de flavonoides presentes en la planta de amaranto, a continuación se presentan los flavonoides que se han estudiado

Cuadro 9. Flavonoides presentes en la planta de amaranto reportados en la literatura

Especie de <i>Amaranthus spp.</i>	Flavonoides reportados	Referencia
<i>A. hypochondriacus</i>	Isoquercetina, hipersoido, rutina	Khanam y Oba, 2013 ²²
<i>A. gangeticus</i>	Quercetina	Miean y col. 2001 ⁴⁵
<i>A. cruentus</i> var. Rawa (brote)	Rutina	Pásko y col. 2008 ⁴⁶

- **Propiedades biológicas de los compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son altamente estudiados pues los relacionan con beneficios a la salud y prevención de enfermedades. Debido a su presencia, ciertos alimentos son clasificados como alimentos funcionales por las altas concentraciones de diferentes tipos de compuestos fenólicos.

- * Actividad antioxidante

La propiedad más estudiada y conocida es su capacidad antioxidante, se centra principalmente en su consumo en la dieta diaria para el beneficio de la salud. Se estima que el consumo promedio es de 25mg/g de alimento al día. El alto contenido de compuestos fenólicos se puede relacionar con la inhibición del daño oxidativo que conduce a enfermedades, son responsables de la inhibición de la oxidación del colesterol de baja densidad y es reportado un efecto benéfico sobre enfermedades como la arteriosclerosis por el consumo constante de frutas y verduras ricas en fenoles simples. En caso de los flavonoides se ha reportado que la capacidad antioxidante depende de la configuración, sustitución y el total de los grupos hidroxilos presentes en la molécula. Dentro de los mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides se encuentran: la supresión de la formación de especies reactivas de oxígeno y regulación o protección de los mecanismos celulares de defensa antioxidante^{39,47,48}.

- * Actividad hepatoprotectiva

Algunos flavonoides como catequina, quercetina, rutina y naringina son reportados con actividad hepatoprotectora, debido a la disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno y glutatión así como la supresión de la expresión de la glutamato-cistein-ligasa relacionados con enfermedades crónicas como la diabetes, las cuales conducen al desarrollo de daños hepáticos⁴⁷.

- * Inmunoregulación

El ácido caféico es reportado como inhibidor selectivo de la biosíntesis de leucotrienos los cuales están involucrados en enfermedades de inmunoregulación, asma y reacciones alérgicas. Derivados de ácido caféico (ácidos dicafeoilquinico y dicafeiltartárico) han demostrado ser potentes inhibidores de la enzima integrasa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1³⁹.

3.3.3 Lípidos

- **Características químicas y clasificación**

Los lípidos son biomoléculas orgánicas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno, en algunas ocasiones presentan en su composición átomos de nitrógeno, fósforo y azufre. Los lípidos constituyen un grupo complejo de moléculas en el que una característica que se cumple frecuentemente es su hidrofobicidad. Debido a la variedad de estructuras que conforman este grupo de compuestos se dividen de acuerdo a su importancia biológica pero también de acuerdo a su estructura molecular donde se ubican los lípidos saponificables, insaponificables y conjugados⁴⁹.

El criterio para realizar esta clasificación es la saponificación la cual consiste en una reacción de hidrólisis alcalina, Los lípidos derivados de ácidos grasos dan lugar a sales alcalinas (jabones) y alcohol, que son fácilmente extraíbles en medio acuoso. No todos los lípidos presentes en una muestra biológica dan lugar a este tipo de reacción, se distinguen por tanto dos tipos de lípidos: saponificables e insaponificables⁵⁰.

Lípidos saponificables

Los lípidos saponificables se agrupan por el tipo de esterificación y modificaciones de ácidos grasos dentro de esta clasificación se encuentran^{49,50}:

- * Ácidos grasos y sus derivados, son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, de acuerdo a la naturaleza de la cadena hidrocarbonada se dividen en: saturados, insaturados y derivados de ácidos grasos.
- * Eicosanoides, se aplica este término a compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos como el ácido araquidónico, se clasifican de acuerdo a las enzimas que intervienen en su síntesis (prostanglandinas, tromboxanos y leucotrienos).
- * Lípidos neutros, son ésteres de ácidos grasos con alcoholes, se identifican de dos tipos: acilgliceroles y ceras.
- * Lípidos anfipáticos, se presentan cuando un lípido posee un grupo fuertemente polar además de la cadena hidrocarbonada hidrofóbica. Se pueden clasificar en función de la naturaleza del alcohol al que se encuentran esterificados: glicerolípidos y esfingolípidos.

Lípidos insaponificables

Los esteroides, isoprenoides y prostanglandinas son lípidos que no participan en la reacción de saponificación^{49,50}.

- * Esteroides, son lípidos derivados de un hidrocarburo tetracíclico saturado, llamado ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano. Los esteroides se forman por la aparición en distintas posiciones de este hidrocarburo de dobles enlaces, y grupos sustituyentes (OH, cadenas carbonadas, etc). Dentro de las moléculas más representativas de los esteroides están los esteroides, son esteroides que tienen un grupo OH en el carbono 3 y una cadena de 8 carbonos ramificada en el carbono 17. Dentro de los esteroides más importantes se encuentra el colesterol, ácidos biliares y vitaminas.
- * Isoprenoides, también llamados terpenos, se forman por la unión de moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP), las estructuras que se originan pueden ser lineales o cíclicas en este tipo de moléculas aparecen enlaces conjugados, estos enlaces pueden ser excitados por la luz o la temperatura al cambiar su posición emiten una señal; por ello, estas moléculas están relacionadas con la recepción de estímulos lumínicos o químicos. A continuación se muestra la clasificación de los terpenos de acuerdo al número de carbonos que los componen

Cuadro 10. Clasificación de terpenos⁵¹.

Nombre	No. de unidades (5C)	Función	Ejemplo
Monoterpenos	2	Aromas y esencias	Geraniol, mentol
Sesquiterpenos	3	Intermediario en la síntesis del colesterol	Farnesol
Diterpenos	4	Formación de pigmentos y vitaminas	Fitol, vitamina A, E, K
Triterpenos	6	Intermediario en la síntesis del colesterol	Escualeno
Tetraterpenos	8	Pigmentos vegetales	Carotenos, xantofilas
Politerpenos	n	Aislantes	Látex caucho

El escualeno (C₃₀ H₁₅) es un triterpeno, sin embargo no cumple enteramente con la regla del isopreno (uniones cabeza-cola), en vez de una disposición de 6 unidades de isopreno unidas cabeza-cola la molécula proviene de la unión de dos moléculas de farnesilo (cola a cola) de 15 unidades de carbono (Figura 15). El escualeno es precursor biológico de muchos triterpenoides, entre ellos el colesterol, en la conversión biológica del lanosterol a colesterol se pierden tres grupos metilo, la cadena hidrocarbonada se reduce a una estructura saturada⁵².

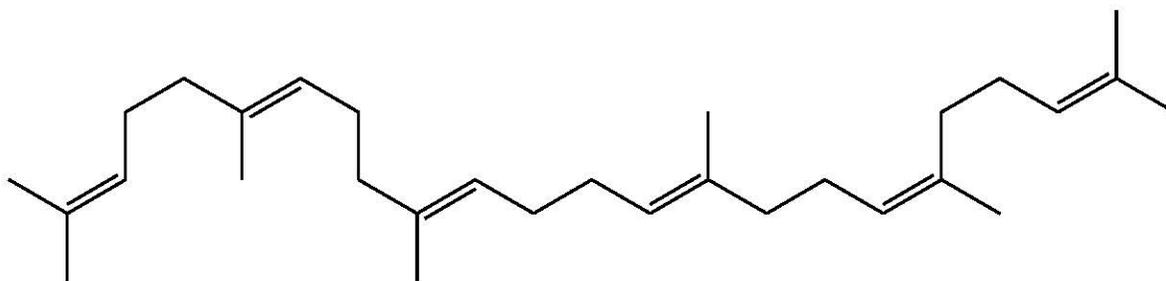


Figura 15. Estructura del escualeno

- **Fuentes de escualeno y esteroides**

La fuente más importante de escualeno es el hígado de tiburón, sin embargo, existen diferentes fuentes vegetales, entre las más importantes se encuentran el aceite de oliva y amaranto, aunque también se han encontrado concentraciones menores en los aceites de palma, germen de trigo, arroz y cacahuate, en el aceite de oliva se obtiene un rendimiento sobre el aceite de aproximadamente 7 mg/ gramo⁵³. Los esteroides son los lípidos insaponificables más abundantes en las plantas, los productos derivados de cereales son fuentes importantes de esteroides, los esteroides más abundantes son: citosterol, campesterol y estigmasterol, es reportado el contenido total de esteroides como 95.5 mg/100g de semilla (centeno), 69.0 mg/100g de semilla (trigo), 76.1 mg/100g de semilla (cebada) y 44.7 mg/100g de semilla (avena)⁵⁴.

- **Presencia de lípidos insaponificables en la familia *Amaranthaceae***

Debido a la importancia de la planta de amaranto en la producción del grano se ha estudiado la composición lipídica principalmente en la semilla a continuación se presentan los reportes de los lípidos insaponificables

Cuadro 11. Lípidos insaponificables presentes en la planta de amaranto reportados en la literatura

Especie de <i>Amaranthus spp.</i>	Lípidos insaponificables reportados	Referencia
<i>A. cruentus</i> (hoja madura) <i>A. hybridus</i> (hoja madura) <i>A. hypochondriacus</i> (hoja madura)	Escualeno	He y Corke, 2003 ⁵⁵
<i>A. tricolor</i> (semilla, tallos y hojas)	Estigmasterol, ergosterol, estigmastenol, espinasterol	Tudor y col. 1984 ⁵⁶
Aceite de semilla	Escualeno, estigmasterol, campesterol, citosterol, α -tocoferol, β -tocoferol.	León-Camacho y col. 2001 ⁵⁷

- **Propiedades biológicas de los lípidos insaponificables**

- * Anticancerígeno

A pesar de que el escualeno es un inhibidor débil de los tumores cancerígenos se ha reportado como agente preventivo o de disminución de crecimiento en diferentes modelos tumorales experimentales ayudado de otras medicinas anticáncer, por ejemplo, Reddy y Couvreur en el 2009⁵¹ reportan la acción en conjunto del ácido oleico y el escualeno aplicado a ratas con cáncer de piel inhibiendo el benzo(α) pireno.

- * Protección en piel

Por parte del escualeno, se reporta como protector contra infecciones bacterianas y fúngicas cuando se administra a pacientes con dermatitis atópica causada por lesiones en la piel. Se ha reportado que el escualeno se acumula en altas concentraciones en la piel, donde juega un papel importante en la protección contra los radicales, previniendo el daño por la peroxidación lipídica, también se reporta que actúa como protector frente al daño oxidativo al ADN de células epiteliales humanas^{51,58}.

- * Efecto antilipidémico

Schonewille y col. en el 2014⁵⁹ reportan la acción de los esteroides como compuestos que disminuyen las concentraciones de colesterol LDL en sujetos hipercolesterolemicos, así como la disminución en la secreción hepática lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés). Se reporta que la ingesta de 1 g de β -sitosterol puede disminuir la absorción del colesterol en un 42%, debido al parecido entre las estructuras de los esteroides y el colesterol, se cree que existe una competencia para su absorción en las células del intestino delgado⁶⁰.

4. Justificación

La importancia de los alimentos con valor agregado ha ido en aumento en los últimos años. En México existe una gran diversidad vegetal destinada para la alimentación. Se tiene particular interés en el uso de vegetales silvestres como alimentos, ya que permite la diversificación de la alimentación y mantener la identidad cultural y gastronómica de cada región. En específico, el consumo del follaje tierno de plantas herbáceas no cultivadas, comúnmente nombradas en México como “quelites”, era muy valorado en la época precolombina y hoy es un recurso importante para la dieta en el campo; sin embargo se ha visto sustituido por el consumo de hortalizas introducidas y comerciales en otras zonas del país, derivando en un consumo y conocimiento de los quelites limitado a las comunidades y pueblos que los utilizan.

La dieta no sólo proporciona los nutrientes básicos para las necesidades metabólicas, también puede contribuir a la mejora de la salud humana, es por eso que se tiene interés en el estudio de ciertos compuestos que han sido reportados como benéficos para la salud. Los estudios referentes a este grupo de alimentos desde el punto de vista nutricional y de composición con respecto a compuestos bioactivos, son escasos en hojas de plantas de la familia *Amaranthaceae*.

Debido a que es un recurso valioso en la alimentación rural de México y existen pocos estudios reportados acerca de compuestos bioactivos, se tiene interés en desarrollar una investigación que realce la importancia del consumo de quelites de la familia *Amaranthaceae*.

5. Hipotesis

Se sabe que en la zona de la Sierra Norte de Puebla existe una continua domesticación de la planta de amaranto como productora de hojas comestibles así como productora de grano, debido a este fenómeno, se espera que tenga un efecto sobre la concentración y perfil de compuestos bioactivos presentes en las colectas de quelites estudiados.

6. Objetivos

6.1 Objetivos generales

- Realizar la identificación de los compuestos bioactivos presentes en 8 colectas de diferentes variedades de quelites de la familia Amaranthaceae: *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus cruentus* raza mexicana, *Amaranthus hypochondriacus* raza azteca y *Amaranthus spinosus* L.
- Realizar la medición cuantitativa mediante técnicas de HPLC y CG de: betalaínas, ácidos fenólicos, flavonoides y lípidos insaponificables.

6.2 Objetivos particulares

- Establecer el mejor método de secado para la obtención de compuestos bioactivos.
- Realizar la medición espectrofotométrica cuantitativa total en las diferentes variedades de quelites de los siguientes grupos de compuestos: betalaínas, clorofilas, carotenos, fenoles y flavonoides.
- Determinar los compuestos bioactivos (flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides y escualeno) presentes en las diferentes variedades de quelites por CCF.
- Cuantificación de compuestos bioactivos por HPLC para amarantina, ácidos fenólicos y rutina, y CG para escualeno.

7. Desarrollo experimental

A continuación se muestra el diagrama general de la metodología planteada para el presente trabajo, se dividió el trabajo en dos etapas:

- Etapa 1. Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos totales, durante esta etapa se estableció el método de secado más adecuado para la conservación de betalaínas y fenoles, los métodos probados fueron, liofilización, secado a la sombra y secado por estufa. Posteriormente se cuantificaron por espectrofotometría los compuestos totales (betalaínas, clorofilas, carotenos, flavonoides y fenoles) además de la identificación por CCF de flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides y escualeno.
- Etapa 2. Cuantificación de compuestos por HPLC Y CG, una vez identificados los principales compuestos de interés se realizó la cuantificación por HPLC para amarantina, ácidos fenólicos y rutina, y CG para escualeno, esto se realizó con la correspondiente comparación con estándares, a excepción de la amarantina de la cual se purificó el estándar y se realizó la correspondiente identificación por RMN.

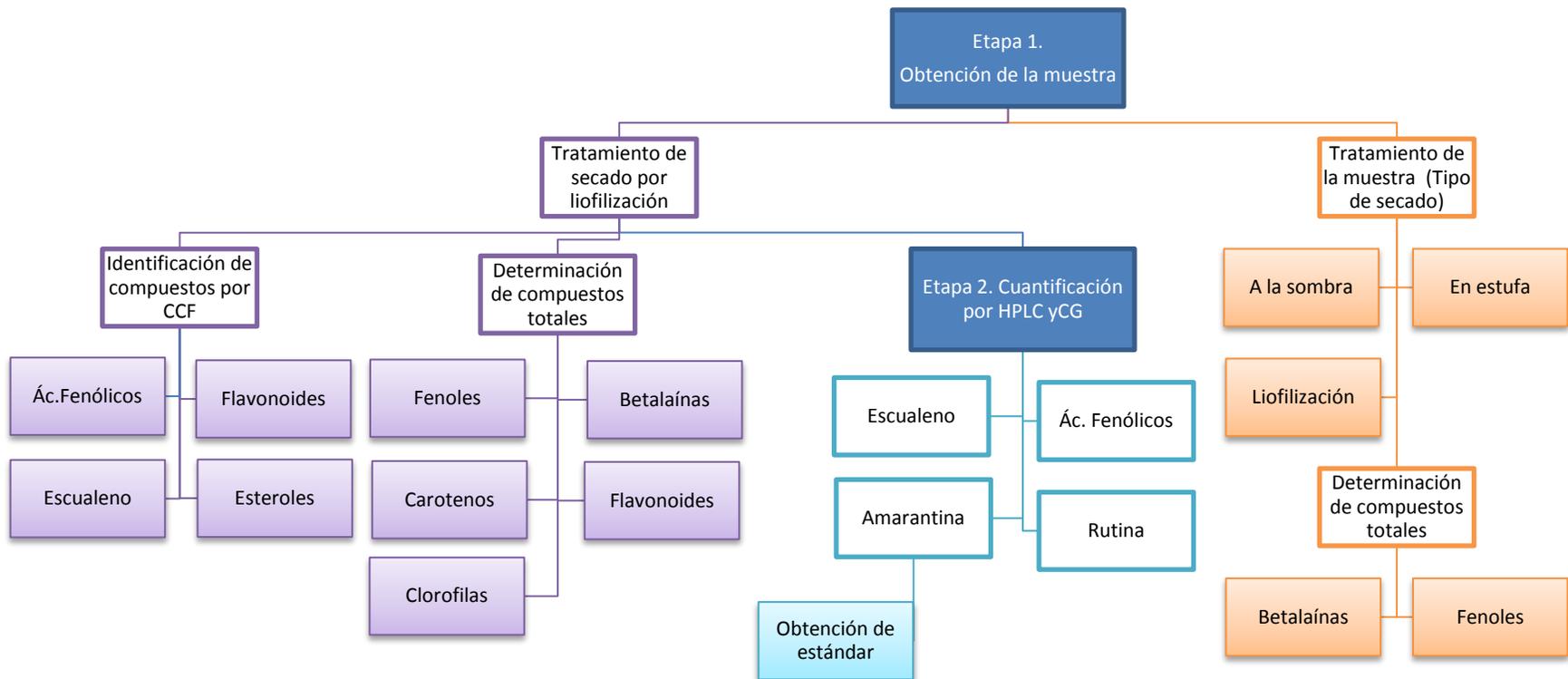


Figura 16. Esquema general de experimentación

7.1 Reactivos

A continuación se muestran los reactivos usados para las diferentes determinaciones realizadas:

Reactivo Folin-Ciocalteu (Hycel de México S.A. de C.V.), y para los estándares de rutina, quercetina, stigmasterol, escualeno, ácidos: caféico, clorogénico, cumárico, dihidroxibenzóico, ferúlico, gálico y sinápico todos marca Sigma-Aldrich.

7.2 Equipos

- Liofilizadora LABCONCO Free zone 4.5, bomba de vacío LABCONCO 117
- Estufa de incubación Riosar 20-60°C
- Sonicador Cole-Parmer 8892
- Rotavapor Buchi R-215 Baño Buchi B-491
- Espectrofotómetro GBC-Cintral
- HPLC Waters, Bomba Binaria 1525, Detector Dual de Absorbancia 2487, Auto-muestreador 2707, Software Empower (para betalaínas y ácidos fenólicos).
- HPLC Infinity, Agilent Technologies, automuestreador 1200, bomba cuaternaria de fase reversa (Qual Pump 1260), Detector de absorbancia (Dione array detector 1260 Agilent Technologies®), Software Chem Station Edition 1.06 (para rutina).
- CG Agilent Technologies 6890N Network System, inyector 7683 Series, Programa Instrument On-line (para escualeno)
- Espectrómetro Agilent 600 DD2 con sonda One NMR

7.3 Procedimiento

7.3.1 Etapa 1. Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos totales

Se obtuvieron las muestras de quelites provenientes de Ecatlán municipio de Jonotla, Puebla, las muestras fueron colectadas e identificadas por el M. en C. Francisco Basurto, con las siguientes características:

- Nombre común: Quintonil rojo
- Nombre científico: *Amaranthus hybridus*
- Fecha de cosecha: 18 de Enero 2014

7.3.1.1 Tratamiento de la muestra

A cada muestra se le aplicó los siguientes tipos de secado.

- Secado a la sombra
- Secado por estufa 40°C
- Liofilización

Una vez que las hojas fueron secadas se aplicó un tratamiento mecánico de molienda y se almacenó con protección de la luz en contenedores de plástico. La elección del método de secado se hizo con base en el resultado de la medición de betalaínas y fenoles totales por espectrofotometría.

7.3.1.2 Determinación de betalaínas totales

La determinación de betalaínas totales se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en García-Cruz y col., en el 2012 ⁶¹. Para la extracción se pesó 1 g y se extrajo con un volumen de 10 mL de metanol:H₂O en una proporción 80:20 de cada una de las muestras sometidas a diferentes métodos de secado. El extracto se mantuvo en agitación durante 20 minutos y posteriormente se sonicó durante 30 minutos, se filtró y se midió por espectrofotometría a 535 nm para betacianinas y 480 nm para betaxantinas, la determinación anterior se realizó por triplicado, para la cuantificación de betalaínas totales se utilizó la siguiente ecuación:

$$B_{(mg\ betalaína/g\ muestra)} = \frac{A * FD * PM * V}{\epsilon * P * L}$$

Donde

B: Betacianina o betaxantina

A: absorbancia (535nm betacianinas y 480nm betaxantinas)

FD: Factor de dilución al momento de leer

PM: Peso molecular (Betanina: 550 g/mol , indicaxantina 308 g/mol)

V: Volumen del extracto

ε: Coeficiente de extinción molar (betanina: 60 000 L/mol cm, indicaxantina: 48 000 L/mol cm)

P: Peso de la muestra

L: Longitud de la celda (1cm)

7.3.1.3 Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu. Para la extracción se pesaron 0.3 g de muestra (por triplicado) y se extrajo con un volumen de 5 mL de metanol sonicando 20 minutos, posteriormente se filtró.

Se tomó una alícuota de 100 µL de extracto resultante y se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 2% después de un tiempo de espera de 2 minutos se agregaron 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido previamente con H₂O proporción 1:1), transcurridos 30 minutos se midió a una absorbancia de 750 nm. La concentración de fenoles se determinó a partir de la elaboración de la curva de calibración tomando como estándar el ácido tánico expresando los resultados como mg de ác. tánico / g muestra (Anexo 2, Tabla 1).

7.3.1.4 Procesamiento de muestras (diferente colecta de quelites)

Se obtuvieron muestras de diferentes especies de quelites con los siguientes datos de colecta:

- Fecha de re-siembra: 26 de marzo del 2014
- Fecha de colecta: 8 de mayo del 2014
- Lugar de re-siembra: Ecatlán Municipio de Jonotla Puebla
- Responsable de colecta: Cristina Mapes Sánchez y Francisco Basurto Peña

Tipos de quelite:

Cuadro 12. Colectas de semillas de quelites de la familia *Amaranthaceae*

Año	Número de colecta	Especie	Lugar de origen
2010	1235	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Estado: Puebla, Municipio: Cuetzalan, Localidad: Xalcauta
2010	1262	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Estado: Puebla, Municipio: Cuetzalan, Localidad: Zacatipan
2012	1370	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Estado: Puebla, Municipio: Francisco Z. Mena, Localidad: Metlatoyuca
2011	1289	<i>Amaranthus cruentus</i> raza mexicana	Estado: Puebla, Municipio: Zapotitlán de Méndez, Localidad: Tuxtla
2012	1392	<i>Amaranthus cruentus</i> raza mexicana	Estado: Puebla, Municipio: Jonotla, Localidad: Ecatlán
2012	1433	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> raza azteca	Estado: Puebla, Municipio: Xochitlán de Vicente Suárez, Localidad: Xochitlán
2010	1272	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> raza azteca	Estado: Puebla Municipio: Hueyapan Localidad: Tanamacoyan
2010	1213	<i>Amaranthus spinosus</i> L.	Estado: Puebla Municipio: Ayotoxco de Guerrero Localidad: Gachupinate

Se le llamó colecta a cada muestra de semilla con ciertas características de especie y lugar de origen, catalogadas directamente por los responsables. Posteriormente estas semillas fueron cultivadas (re-siembra) en el municipio de Jonotla Puebla en condiciones controladas por los agricultores.

Los resultados de betalaínas y fenoles totales indicaron que el método de secado más adecuado para el tratamiento de la muestra fue el secado por liofilización. Las muestras descritas anteriormente fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ previamente para poder ser liofilizadas, después del secado se aplicó un tratamiento mecánico de molienda y se almacenó en recipientes protegidos de la luz solar.

7.3.1.5 Determinación de compuestos totales

La determinación de compuestos totales se realizó por espectrofotometría.

- **Betalaínas Totales**

Se realizó la misma técnica que en el punto 7.3.1.2 betalaínas totales.

- **Fenoles Totales**

Se realizó la misma técnica que en el punto 7.3.1.3 fenoles totales.

- **Flavonoides Totales**

La determinación de flavonoides totales se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Khanam y Oba en el 2013 ²². La extracción se realizó a partir de 0.3 g de muestra y 5 mL de metanol sonicando durante 20 minutos, posteriormente se filtró, la determinación anterior fue realizada por triplicado.

Se tomó 1 mL del extracto, se agregaron 1400 μL de H_2O y 300 μL NaNO_3 al 5%, después de un tiempo de espera de 5 minutos se adicionaron 300 μL de AlCl_3 al 10%, 2 mL de NaOH 1 M y 5 mL de H_2O . Se midió a una absorbancia de 415 nm. El cálculo de flavonoides totales se determinó a partir de la curva de calibración usando como estándar catequina y expresando los resultados como mg catequina/ g muestra (Anexo 2, Tabla 2).

- **Carotenos Totales**

La determinación de carotenos totales se hizo de acuerdo a lo reportado en Rodríguez-Amaya en 1999 ⁶², Se extrajeron 0.3 g de muestra con 20 mL de acetona fría (por triplicado), filtrando a través de un embudo Buchner, lavando con el mismo volumen hasta que no fue posible extraer más color de la muestra. Posteriormente se realizó una partición con hexano en un embudo de separación agregando pequeñas porciones de agua para fomentar la separación de fases, se colectó la parte del hexano y se aforó nuevamente a 20 mL.

Se midió a una absorbancia de 444 nm, el cálculo se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente ecuación

$$X_{/(\mu\text{g caroteno/g muestra})} = \frac{A * y * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * P * 100}$$

Donde:

X: Caroteno (β – caroteno – 5,6 – epoxido)

A: absorbancia (444nm) *y*: volumen del extracto (mL)

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$: coeficiente de absorción (2590 para β – caroteno – 5,6 – epoxido)

P: peso de la muestra (g)

- Clorofilas Totales

La determinación de clorofilas totales se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Adebooye y col., en el 2008 ⁶³. Se pesaron 5 mg de muestra (por triplicado) y se extrajeron con 50 mL de acetona: H₂O 80:20 en fracciones de 10 mL hasta que ya no pudo extraerse más color. Se protegió de la luz y se afora nuevamente a 10 mL. Se midió a una absorbancia de 662 nm (clorofila a) y 645 nm (clorofila b). El cálculo de clorofila se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$Cl_a (\mu\text{g clorofila/mL}) = 10.81 * abs_{662} - 0.75 * abs_{645}$$

$$Cl_b (\mu\text{g clorofila/mL}) = 19.02 * abs_{645} - 3.98 * abs_{662}$$

$$Cl_T (\mu\text{g clorofila/mL}) = 6.83 * abs_{662} + 18.27 * abs_{645}$$

7.3.1.6 Identificación de compuestos por CCF

La identificación de compuestos se llevó a cabo a partir de la extracción con diferentes disolventes a través de cromatografía en capa fina.

- Ácidos Fenólicos

Se realizó una extracción de 0.3 g de muestra en 5 mL de metanol sonicando durante 10 minutos, posteriormente se filtró y se realizó la cromatografía en capa fina. El sistema de elución se fijó como hexano: acetato de etilo: ác. acético 4:6: 0.5 usando placas de sílice como fase estacionaria. El revelador usado fue una solución de sulfato cérico al 3.5%. Se usaron estándares comerciales como referencia para el Rf.

- **Flavonoides**

Se realizó una extracción de 0.3 g de muestra en 5 mL de metanol sonicando durante 10 minutos, posteriormente se filtró y se realizó la cromatografía en capa fina. Se establecieron tres sistemas de elución para determinar la presencia de quercetina, catequina y rutina.

El sistema de elución para quercetina (usándose quercetina comercial al 1% como estándar) se fijó como diclorometano: acetato de etilo: ác. fórmico 7:3:0.1 usando placas de sílice como fase estacionaria, el revelador usado fue una solución metanólica de anisaldehído al 0.5%.

El sistema de elución para catequina se fijó como acetato de etilo: acetona: ác. acético 9:1:0.5 usando como estándar catequina comercial al 1%, como fase estacionaria placas de sílice y como revelador una solución metanólica de anisaldehído al 0.5%.

El sistema de elución para rutina (usándose rutina comercial al 1% como estándar) se estableció de acuerdo a lo reportado en Altemimi y col., en el 2015 ⁶⁴ estableciéndose como acetato de etilo: metanol: ác. acético 7:3:1 usando fase estacionaria placas de sílice y como revelador una solución etanólica de cloruro férrico al 5%.

- **Fracción lipídica**

Se realizó una extracción de 0.3 g de muestra en 5 mL de diclorometano sonicando durante 10 minutos, posteriormente se filtró y se realizó la cromatografía en capa fina. Se usó estigmasterol al 1% en diclorometano como estándar de referencia así como una mezcla comercial de esteroides. El sistema de elución se fijó como hexano: dietiléter: ác. acético 3:2:0.5 usando placas de sílice como fase estacionaria y como revelador una solución metanólica de anisaldehído al 0.5%.

Se realizó una extracción de 0.3 g de muestra en 5 mL de diclorometano sonicando durante 10 minutos, posteriormente se filtró y se realizó la cromatografía en capa fina. Se usó escualeno al 1% como estándar, la fase móvil para la placa cromatográfica fue hexano: diclorometano 9:1 usando como revelador una solución metanólica de anisaldehído al 0.5%.

7.3.2 Etapa 2. Cuantificación de compuestos por HPLC Y CG

Una vez determinados los compuestos a través de las determinaciones espectrofotométricas y por CCF se realizó la identificación y cuantificación de compuestos específicos por HPLC y CG.

7.3.2.1 Cuantificación de amarantina

- **Purificación de estándar de amarantina**

La obtención del estándar se realizó a partir de la purificación de la colecta que mostró una alta concentración de betalaínas totales: *Amaranthus cruentus* raza mexicana (muestra 1392), se llevo a cabo en el laboratorio 321 del Edificio E de la Facultad de Química .

Obtención del extracto: El método de extracción usado fue el señalado en la sección de betalaínas totales, una vez obtenido el extracto filtrado se completa con un volumen de H₂O a manera de tener un volumen final 50:50 metanol: H₂O. Posteriormente se realizaron lavados con diclorometano para eliminar la clorofila, y se concentró en rotavapor a una temperatura de 20°C hasta llegar a sequedad.

Purificación: La purificación del extracto se llevó a cabo por cromatografía en columna usando como fase estacionaria celulosa (carboximetilcelulosa de intercambio cationico) y como fase móvil agua destilada. Se colectaron fracciones de aproximadamente 1 mL y de acuerdo al gradiente de color (Figura 17).



Figura 17. Gradiente de color en columna para betalaínas

La purificación fue monitoreada por placa cromatografica con el sistema de elución reportado en Soriano-Santos y col. en el 2007⁶⁵ fijado como 2-propanol:etanol: H₂O: ác. Acético 2: 3.5: 4: 0.5. Las fracciones con un R_f similar fueron juntas y concentradas en rotavapor a temperatura de 20 °C hasta llegar a sequedad y monitoreando el peso. La muestra purificada fue identificada por resonancia magnética nuclear (RMN).

- **Identificación por RMN**

La identificación por RMN se llevó a cabo en las siguientes condiciones

Cuadro 13. Condiciones de uso de RMN para amarantina

Sistema	Condiciones	
	1H	13C
Frecuencia (MHz)	600	150
Número de scans	128	4096
Disolvente	D ₂ O	
Temperatura (°C)	25	

- **Extracción de betalainas**

La extracción de betalainas para las muestras de diferentes colectas de quelites se realizó por triplicado y siguiendo lo descrito en el punto 6.3.1.1 betalainas totales con diferencia de un peso de 3 g y un volumen de 35 mL de metanol: H₂O.

- **Cuantificación de amarantina**

La cuantificación de amarantina se llevó a cabo a partir de la muestra purificada e identificada por RMN usándose como estándar. Y con la elaboración de la curva patrón el método para HPLC se realizó de acuerdo a lo reportado en Schliemann y col., en el 2001⁶⁶. A continuación se presentan las condiciones del método de medición

Cuadro 14. Condiciones HPLC amarantina

Sistema	Condiciones		
Columna	ODS Hypersil Gold C18 (250x 4.6mm, 5μ)		
Fase móvil	A: Ácido acético 1% B: Acetonitrilo		
Flujo (mL/min)	1		
Inyección(μL)	20		
Longitud de onda (nm)	480 y 536		
	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
Gradiente		100	0
	35.00	76	24
	60.00	100	0

7.3.2.1 Cuantificación de ácidos fenólicos

- **Extracción de ácidos fenólicos**

La extracción de ácidos fenólicos se llevó a cabo por hidrólisis. Se pesó 1 g de muestra con un volumen de 10 mL de NaOH 2 N posteriormente se sonicó durante 30 minutos. Se llevó a pH 3-4 con ácido clorhídrico concentrado y se sonicó nuevamente por 30 minutos, el extracto resultante fue filtrado y se realizó una partición con diferentes volúmenes de acetato de etilo, se recuperó la fracción de acetato de etilo, la cual fue evaporada a sequedad, para la cuantificación en HPLC se recuperó el extracto seco con metanol con filtración previa en filtro Millipore 0.45 µm.

- **Cuantificación de ácidos fenólicos**

La cuantificación de ácidos fenólicos se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Islas-Gómez en el 2013⁶⁷ con estándares comerciales de los siguientes ácidos: caféico, clorogenico, cumárico, dihidroxibenzóico, ferúlico, y gálico. Se determinó la concentración a partir de las curvas de calibración realizadas por HPLC, a continuación se presentan las condiciones del método de medición

Cuadro 15. Condiciones HPLC para ácidos fenólicos

Sistema	Condiciones
Columna	ODS Hypersil (250x46mm; 5µm)
Fase móvil	A: ácido acético 1% B: metanol
Inyección(µL)	20
Longitud de onda (nm)	325

El método se llevó a cabo por gradiente de la siguiente manera

Cuadro 16. Gradiente para método de HPLC ácidos fenólicos

Tiempo (min)	Flujo	%A	%B
	0.90	75.00	25.00
7.00	0.90	60.00	40.00
8.00	0.90	70.00	30.00
9.00	0.90	85.00	15.00
11.00	1.00	90.00	10.00
12.00	1.00	85.00	15.00
12.50	1.00	70.00	30.00
13.00	1.00	75.00	25.00
13.50	1.00	75.00	25.00
14.00	1.00	70.00	30.00
15.00	1.00	75.00	25.00
18.00	0.90	75.00	25.00

7.3.2.2 Cuantificación de rutina

- **Extracción de rutina**

La extracción de rutina se llevó a cabo con una modificación al método reportado por Repo-Carrasco-Valencia y col., en el 2010⁴¹. Se pesó 0.5 g de muestra (por triplicado) y se aforó a 10 mL para posteriormente sonicarse durante 30 minutos, el extracto resultante fue nuevamente filtrado para su análisis en HPLC por filtro Millipore 0.45 µm.

- **Cuantificación de rutina**

La cuantificación de rutina se llevó a cabo a partir de la curva de calibración realizada por HPLC, la técnica empleada fue reportada por Ovalle-Magallanes y col., en el 2014⁶⁸. A continuación se presentan las condiciones usadas en el ensayo

Cuadro 17. Condiciones de HPLC para rutina

Sistema	Condiciones
Columna	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm.)
Fase móvil	A: Ácido fosfórico 1% B: Metanol: Acetonitrilo (5:15)
Flujo (mL/min)	1.2
Inyección(µL)	20
Longitud de onda (nm)	254 y 280

El método se llevó a cabo por gradiente con los siguientes tiempos

Cuadro 18. Gradiente para método de HPLC de rutina

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
3	75	25
6	70	30
9	65	35
12	60	40
15	55	45

7.3.2.3 Cuantificación de escualeno

- **Extracción de escualeno**

La extracción de escualeno se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Cortés en el 2005⁶⁹. Se pesó 5 g de muestra (por triplicado) extrayendo con 100 mL de hexano sonicando durante 60 minutos. Posteriormente se filtro y se evaporó el disolvente hasta llegar a sequedad. Este extracto

seco se sometió a saponificación. Con equipo de reflujo se adicionaron 25 mL de solución metanólica de NaOH 2 N al 95%, se sometió a ebullición suave durante 30 minutos. Una vez terminado este tiempo se transfirió el extracto a un embudo de separación lavando el matraz con H₂O y con diclorometano, se recuperó la fracción de diclorometano y se concentró a sequedad, para la cuantificación por CG se recuperó el extracto seco con diclorometano.

- **Cuantificación de escualeno**

La cuantificación de escualeno se llevó a cabo por cromatografía de gases usando un estándar comercial, a continuación se presentan las condiciones de trabajo

Cuadro 19. Condiciones de CG para escualeno

Sistema	Condiciones
Columna	Modelo No. JW 122-5532 db-5ms
Inyector	Temperatura: 220°C
	Presión: 7.96 psi (constante)
	Split: 5.4:1
	Gas acarreador: H ₂
	Flujo total: 10.7 mL/min
Detector FID	Temperatura: 300°C
	Flujo H ₂ (mL/min): 400
	Flujo aire (mL/min): 450
	Flujo N ₂ (mL/min): 5.0
Inyección(μL)	1

El método se llevó a cabo con el siguiente programa de temperaturas

Cuadro 20. Programa de temperaturas para medición de escualeno en CG

	°C/min	Próxima temperatura	Minutos de espera	Tiempo de corrida
Inicial		200	1.00	1.00
Rampa 1	15.00	260	5.00	10.00
Rampa 2	5.00	300	17.00	35.00

7.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statgraphics Centurion XV.II, las muestras se analizaron por triplicado, con Análisis de varianza de un factor para la determinación del método de secado y las determinaciones cuantitativas de compuestos totales, amarantina, ácidos fenólicos, rutina, escualeno con un 95% de confianza. Para la comparación entre colectas se utilizó la prueba múltiple de rangos con el método LSD a un 95.0% de confianza.

8. Resultados y discusión

Los quelites son un alimento culturalmente importante dentro de la población rural mexicana, por la diversidad de especies y su facilidad de cultivo se establecieron como parte de la alimentación básica en la época precolombina. La planta del amaranto ha sido estudiada principalmente como fuente de grano, esta investigación fue enfocada al estudio de los compuestos bioactivos presentes en la parte foliar de la planta de amaranto, la cual fue dividida en dos etapas:

- * Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos totales
- * Cuantificación de compuestos por HPLC y CG

Los resultados que se presentan a continuación

8.1 Etapa 1. Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos totales

Durante esta etapa se estableció el método de secado más adecuado para la conservación de dos tipos de compuestos principales: betalaínas y fenoles. Posteriormente se cuantificaron los compuestos totales por espectrofotometría: betalaínas, clorofilas, carotenos, fenoles y flavonoides. También se identificaron otros grupos por CCF: ácidos fenólicos, flavonoides y lípidos insaponificables.

8.1.1 Tratamiento de la muestra

La finalidad de esta sección fue determinar el mejor método para la conservación y manejo de las muestras de quelites de la familia *Amaranthaceae* recibidas.

Se realizó la recepción de una primera muestra de *Amaranthus hybridus*, a partir de esta se estableció el método de secado más adecuado para la conservación y almacenamiento de las colectas con las cuales se trabajaría posteriormente. Con la elección del método de secado se buscó la mejor preservación de los compuestos bioactivos presentes en las hojas de quelites, se determinaron betalaínas y fenoles totales. El método de secado se centró en la preservación de estos grupos de compuestos debido a la importancia de las betalaínas como compuestos fundamentales en la coloración de estas plantas y los fenoles como compuestos más estudiados por su actividad antioxidante. A continuación se muestran los valores de betalaínas y fenoles totales para los métodos de secado utilizados:

- Secado a la sombra
- Liofilización
- Secado por estufa (40°C)

Cuadro 21. Concentración de betalainas y fenoles totales con diferentes métodos de secado

Método de secado	Secado a la sombra	Liofilización	Secado por estufa
Betalainas totales ($\text{mg}_{\text{BT}}/\text{g}_{\text{mtra}}$)	1.2761 ± 0.0829	1.6161 ± 0.0425	0.9416 ± 0.0334
Fenoles totales ($\text{mg}_{\text{Gac.Tánico}}/\text{g}_{\text{mtra}}$)	13.0097 ± 1.3932	13.6273 ± 0.5671	7.013 ± 0.7482

De acuerdo al análisis estadístico realizado (Anexo 1, Tabla 1) existe una diferencia significativa entre los valores de betalainas para cada uno de los diferentes métodos de secado utilizados (Anexo 1, Tabla 1.1) por lo que se puede decir que el tipo de secado utilizado sí influye en la concentración de betalainas totales. Para las determinaciones de fenoles totales, la prueba de rangos múltiple (Anexo 1, Tabla 2.2) mostró diferencia entre los valores del método de secado por estufa con los métodos de secado a la sombra y liofilización pero no entre los métodos de secado a la sombra y secado por liofilización. Debido a que los valores de concentración de betalainas totales muestran una diferencia estadísticamente significativa y los mayores valores de betalainas y fenoles los expresa el tratamiento de secado por liofilización se eligió este método para el siguiente grupo de muestras tratadas.

La estabilidad de las betalainas se ve afectada por diferentes factores, tal es el caso de la actividad acuosa (a_w) que es la relación que existe entre la presión de vapor de un alimento y la presión de vapor del agua, este factor está estrechamente relacionado con la humedad del alimento y con su conservación. El a_w es un factor crucial en la susceptibilidad de la ruptura del enlace del aldehído nitrogenado de la molécula de betacianina, así como descarboxilación y deshidrogenación, este efecto se debe a la reducción de movilidad para las especies reactivas oxidantes así como limitar la solubilidad del oxígeno. Se reporta el incremento en los niveles de degradación de betalainas cuando se incrementa el a_w de 0.32 a 0.75. Otro factor importante en la degradación de betalainas es la temperatura, este factor puede ser el más influyente en la degradación de betalainas ya que esta incrementa con el aumento de la temperatura; durante el proceso de calentado se ha demostrado que la betanina es degradada por isomerización, descarboxilación o ruptura de enlaces dando como resultado una pérdida del color rojo y la aparición de un color café claro, la deshidrogenación de la betanina conduce a la formación de la neobetanina y una coloración amarilla ^{24,26}.

8.1.2 Procesamiento de muestras (diferente colecta de quelites)

El segundo lote de muestras recibidas corresponden a diferentes especies de quelites del género *Amaranthus* las cuales se muestran a continuación

Cuadro 22. Variedades de quelites de la familia *Amaranthaceae* con el número de colecta correspondiente

Número de colecta	Especie
1235	<i>Amaranthus hybridus</i> L.
1262	<i>Amaranthus hybridus</i> L.
1370	<i>Amaranthus hybridus</i> L.
1289	<i>Amaranthus cruentus</i> raza mexicana
1392	<i>Amaranthus cruentus</i> raza mexicana
1433	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> raza azteca
1272	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> raza azteca
1213	<i>Amaranthus spinosus</i> L.

Todas las especies fueron plantadas en cultivo común en el municipio de Jonotla, Puebla, sin embargo, las semillas provienen de diferentes municipios del estado de Puebla.

Mapes-Sánchez reporta en el 2001¹³ la hibridación continua que se da por el manejo humano en la zona de la Sierra Norte e Puebla haciendo difícil una clasificación definida. Uno de los parámetros para realizar esta clasificación es la coloración de las hojas, el nombre coloquial que da la población rural a los quintoniles generalmente se hace con base en su coloración, se le da el nombre de quintonil rojo a la especie *A. hypochondriacus* o quintonil blanco a la especie *A. cruentus*^{10,12}.

Para el secado de las hojas de diferentes colectas de quelites de la familia *Amaranthaceae* se usó el método de liofilización para su conservación y fácil manejo, que, como se mostró en los resultados (punto 8.1.1) es el método que resultó más apropiado para el manejo de las hojas en el presente trabajo. Las diferentes colectas fueron congeladas a -80°C para posteriormente someterse al proceso de liofilización, pulverización y almacenamiento con protección solar. La cuantificación de compuestos totales e identificación por CCF se realizó con los pulverizados de hojas secas.

8.1.3 Determinación de compuestos totales

La determinación de compuestos bioactivos totales se realizó con la finalidad de establecer un panorama general de la composición de las muestras a través de la medición por espectrofotometría. Los compuestos determinados fueron 1) betalaínas, 2) clorofilas, 3) carotenos, 4) fenoles y 5) flavonoides. A continuación se presenta el

Cuadro 23 con los valores de compuestos totales que contribuyen a la coloración en las hojas de las diferentes especies de *Amaranthus spp.*

Cuadro 23. Valores promedio de betalaínas, betacianinas, betaxantinas, clorofilas y carotenos totales para diferente colecta de quelite

Colecta de quelite	Betacianinas (mg /g mtra)	Betaxantinas (mg /g mtra)	Betalaínas (mg /g mtra)	Clorofilas (mg /g mtra)	Carotenos (µg β-caroteno /g mtra)
<i>A. hybridus</i> L. 1235	0.240 ± 0.011	0.299 ± 0.023	0.540 ± 0.035	1.816 ± 0.064	328.013 ± 37.016
<i>A. hybridus</i> L. 1262	0.301 ± 0.022	0.360 ± 0.007	0.662 ± 0.024	3.028 ± 0.462	318.197 ± 39.562
<i>A. hybridus</i> L. 1370	0.672 ± 0.029	0.631 ± 0.016	1.302 ± 0.046	2.243 ± 0.152	139.484 ± 21.183
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1289	0.188 ± 0.0006	0.197 ± 0.006	0.385 ± 0.005	2.032 ± 0.085	155.392 ± 16.659
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1392	0.568 ± 0.044	0.547 ± 0.024	1.114 ± 0.020	3.276 ± 0.236	436.646 ± 83.481
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1433	0.537 ± 0.076	0.593 ± 0.027	1.130 ± 0.099	2.838 ± 0.258	133.286 ± 29.845
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1272	0.283 ± 0.004	0.195 ± 0.008	0.478 ± 0.011	2.487 ± 0.108	195.626 ± 4.381
<i>A. spinosus</i> L. 1213	0.627 ± 0.064	0.539 ± 0.019	1.166 ± 0.051	1.698 ± 0.117	441.718 ± 18.177

1) Betalaínas

Los valores de betalaínas más altos los muestra la especie *A. hybridus* L. (colecta 1370). De acuerdo al análisis estadístico (Anexo 1 Tabla 3) existe una diferencia significativa entre las colectas de *Amaranthus* con respecto al contenido de betalaínas totales, la prueba de rango múltiples indica que existe diferencia significativa entre casi todas las colectas de quelites exceptuando las muestras *A. spinosus* L. (1213), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. cruentus* raza mexicana (1392) entre las cuales no existe una diferencia significativa (Anexo 1, Tabla 3.1), estas especies también mostraron alto contenido de betalaínas.

Se observa que los mayores valores de betalaínas los muestran diferentes especies de quelites, como se dijo anteriormente, se sabe que el proceso de domesticación en la zona de la Sierra Norte de Puebla produce similitud entre las diferentes especies, este punto se puede ejemplificar claramente con la muestra *A. hybridus* L. (1370) la cual muestra valores de betalaínas mucho más altos comparados con las muestras de igual especie *A. hybridus* L. colectas 1235 y 1262.

El valor más alto de betacianinas lo mostró la especie *A. hybridus* L. (1370), sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa con la especie de *A. cruentus* raza mexicana (1392), también las especies con un contenido un poco más bajo de betacianinas no mostraron diferencia estadística significativa (*A. spinosus* L. (1213), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. hypochondriacus* raza azteca (1433)), (Anexo 1, Tabla 4.1). En el caso de las betaxantinas el valor más alto también lo mostró igualmente la especie *A. hybridus* L. (1370), todas las colectas de quelites mostraron diferencias significativas en este caso, con excepción de *A. spinosus* L. (1213) con *A. cruentus* raza mexicana (1392) al igual que *A. hypochondriacus* raza azteca (1272) con *A. cruentus* raza mexicana (1289), (Anexo 1, Tabla 5.1).

Khanam y Oba en el 2013²² obtuvieron valores de betalaínas de diferentes especies y variedades en un rango de 3.012-6.094 µg/g de peso seco, Hongyan y col., en el 2015²³ reportan valores en un rango de 0.169-0.209 mg/g de peso seco. Las concentraciones que se obtuvieron en este trabajo tienen un rango de 0.385-1.302 mg/g de peso seco siendo mayores que los encontrados en la literatura, Cai y col. en 1998⁷⁰ reportaron valores de betacianinas extraídas de diferentes partes de la planta, en hojas para la especie de *A. tricolor* variedad Tr 010 (cultivo originario de China) 143 ±4.5 mg/ 100g de peso fresco y para la variedad Tr 015 (cultivo originario de India) un valor de 74 ±3.2 mg/ 100g de peso fresco, estos valores fueron similares a los obtenidos en esta investigación.

2) Clorofilas

Las clorofilas son el compuesto con la concentración más alta en todas las colectas, el mayor contenido de clorofilas lo mostró la muestra *A. cruentus* raza mexicana (1392). El análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa entre los valores de clorofilas para todas las muestras de quelites (Anexo 1, Tabla 6).

Khanam y Oba reportaron en el 2013²² valores de clorofila en un intervalo de 2.59-3.83 mg/g de peso seco, que coinciden con los obtenidos para este trabajo (1.70-3.28 mg/g de peso seco).

El estudio de compuestos bioactivos en hojas de betabel (*Beta vulgaris subsp.cicla*) no es tan amplio como en las hojas de amaranto, sin embargo se tienen reportes del contenido de clorofilas dependiendo del suministro de nitrógeno con un valor promedio de 19.36 mg/g de peso seco el cual es mayor a los reportados en esta investigación⁷¹.

3) Carotenos

Por parte del contenido de carotenos, fueron los valores más bajos presentes en las hojas de amaranto, la mayor concentración la tiene la muestra de *A. spinosus* L. (1213), el análisis estadístico demostró que existe diferencia significativa entre todos los valores de carotenos (Anexo 1, Tabla 7).

Khanam y Oba en el 2013 ²² también reportaron valores de carotenos totales de 270.18 a 486.31 µg/g de peso seco, estos valores coinciden con los obtenidos en este trabajo (133.29-441.72 µg/g de peso seco).

El contenido de carotenos en hojas de betabel también se ha estudiado variando la concentración de fuentes de nitrógeno, el promedio reportado fue de 4.28 mg/ g de peso seco, un poco mayor a lo encontrado en este trabajo ⁷¹.

Por parte de los compuestos fenólicos se presenta el Cuadro 24 que muestra el contenido de fenoles y flavonoides totales.

Cuadro 24. Valores promedio de fenoles y flavonoides totales para diferentes colectas de quelites

Colecta de quelite	Fenoles (mg $\frac{\text{Ác. Tánico}}{\text{g mtra}}$)	Flavonoides (mg $\frac{\text{Catequina}}{\text{g mtra}}$)
<i>A. hybridus</i> L. 1235	8.059 ±0.402	7.354 ±0.819
<i>A. hybridus</i> L. 1262	10.965 ±0.962	7.398 ±0.742
<i>A. hybridus</i> L. 1370	12.920 ±1.473	6.850 ±1.435
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1289	8.682 ±0.462	8.115 ±0.378
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1392	12.645 ±1.465	7.876 ±2.264
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1433	12.354 ±0.643	8.427 ±0.835
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1272	11.147 ±1.562	7.825 ±0.382
<i>A. spinosus</i> L. 1213	12.392 ±1.528	7.667 ±0.425

4) Fenoles

El análisis estadístico de fenoles totales mostró diferencia significativa entre las muestras (Anexo 1 Tabla 8), la prueba múltiple de rangos (Anexo 1, Tabla 8.1) agrupa a las colectas en dos grupos que presentan similitud: *A. hybridus* L. (1235) y *A. cruentus* raza mexicana (1289), mientras que el otro grupo está conformado por las colectas restantes y son también las que muestran los mayores valores de fenoles totales, la concentración más alta la registró *A. hybridus* L (1370).

Khanam y Oba en el 2013 ²² reportaron valores por debajo de los presentados en este trabajo (625.72-854.29 µg/g de peso seco), por otro lado los resultados de Hongyan y col., en el 2015 presentan valores en un intervalo de 10.47-14.94 mg/g de peso seco que fueron similares a los presentados en esta investigación.

Los reportes de fenoles presentes en hojas de betabel (*Beta vulgaris subsp.cicla*) son expresados en Ninfali y Angelino en el 2013 ⁷² con un valor de 11.12 mg/g de peso seco, estos valores se encuentran dentro de los descritos en este estudio.

5) Flavonoides

Los valores de flavonoides totales no mostraron diferencia significativa entre cada colecta de quelite (Anexo 1 Tabla 9), el valor más alto lo mostró *A. hypochondriacus* raza azteca (1433).

Reportes previos indican valores de flavonoides totales en un intervalo de 289.62-419.85 µg/g de peso seco ²² y 6.51-11.40 mg/g de peso seco ²³, los últimos fueron similares a los obtenidos en este trabajo.

Los valores de flavonoides totales presentes en hojas de betabel es de 7.92 mg/g de peso fresco siendo similares a los reportados en esta investigación⁷².

La comparación de valores reportados de compuestos totales carotenos, fenoles y flavonoides en hojas de amaranto y hojas de betabel se encuentran dentro de los mismos intervalos, para el caso de clorofilas se encontró una mayor concentración en las hojas de betabel. Posterior a la cuantificación de compuestos bioactivos totales se realizó la identificación por CCF para establecer de manera cualitativa ciertos compuestos de interés.

8.1.4 Identificación de compuestos por CCF

La caracterización por CCF da una identificación cualitativa de los compuestos presentes la fracción de extracto de hojas de amaranto como metanol y diclorometano, se analizó la presencia de diferentes grupos de compuestos bioactivos 1) ácidos fenólicos 2) flavonoides y 3) fracción lipídica. El orden de muestreo para cada colecta de quelite fue el mismo para todas las placas cromatográficas: *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213). A continuación se presentan los compuestos pertenecientes a la fracción de metanol.

1) Ácidos fenólicos

El estudio detallado de la composición de ácidos fenólicos se ha abarcado en diferentes estudios reportándose tanto ácidos hidroxicinámicos como ácidos hidroxibenzóicos^{22 73 23} donde se determina la presencia de ácidos fenólicos específicos como gálico, vainillínico, siringico, caféico, clorogénico, cumárico, sinápico, ferúlico, benzóico, entre otros.

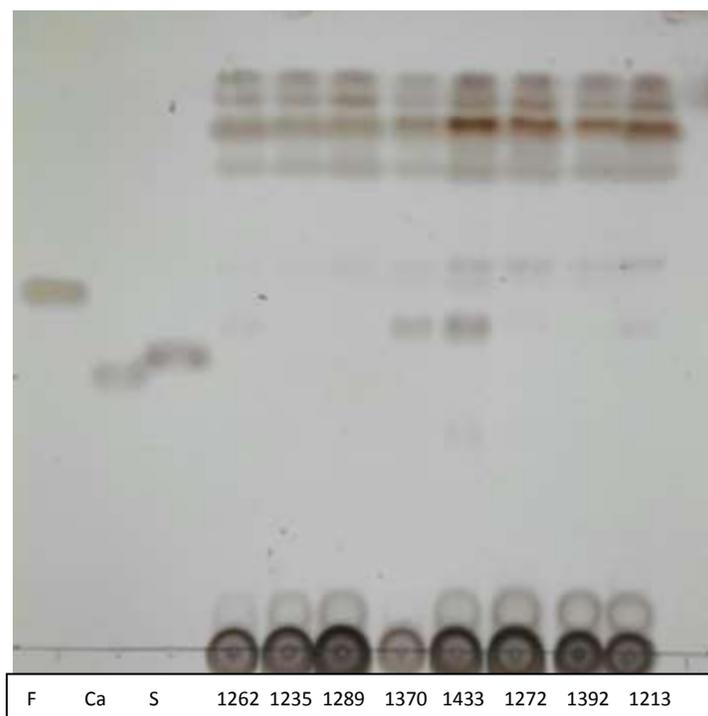


Figura 18. CCF para ácidos fenólicos. F: ferúlico, Ca: caféico, S: sinápico, *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213).

En la Figura 18 se muestra la CCF donde se observa de mejor manera el Rf correspondiente a los estándares (ferúlico, caféico, y sinápico), sin embargo, las señales que muestran las diferentes colectas de quelites son poco visibles. Es posible que exista la presencia de ácido ferúlico de acuerdo al comportamiento cromatográfico observado para las muestras. No es posible reportar la presencia de ácido caféico o sinápico por este método pues las señales no son evidentes o visibles.

2) Flavonoides

- Quercetina

La quercetina y sus glucósidos son de los compuestos más estudiados al determinar el perfil de flavonoides presentes en la planta de amaranto, Khanam y Oba en el 2013²² reportan la presencia de isoquercetina (quercetina 3-glucosido), hiperosido (quercetina 3-galactosido) y rutina (quercetina 3-rutinosido) en hojas de diferentes variedades de amaranto. Hongyan y col., en el 2015²³ realizaron un estudio de compuestos fenólicos presentes en diferentes partes de la planta

donde se evaluó la presencia de rutina, kaempferol 3-rutinosido, y quercetina; sin embargo, la presencia de quercetina fue negativa para la parte foliar. Mian y Mohamed en el 2001⁴⁵ compararon la presencia de diversos flavonoides en plantas tropicales comestibles, las hojas de amaranto presentaron concentraciones bajas o nulas, 29.5 mg de catequina/ kg de muestra para *A. gangeticus* y no reportan la presencia en las hojas de *A. spinosus*.

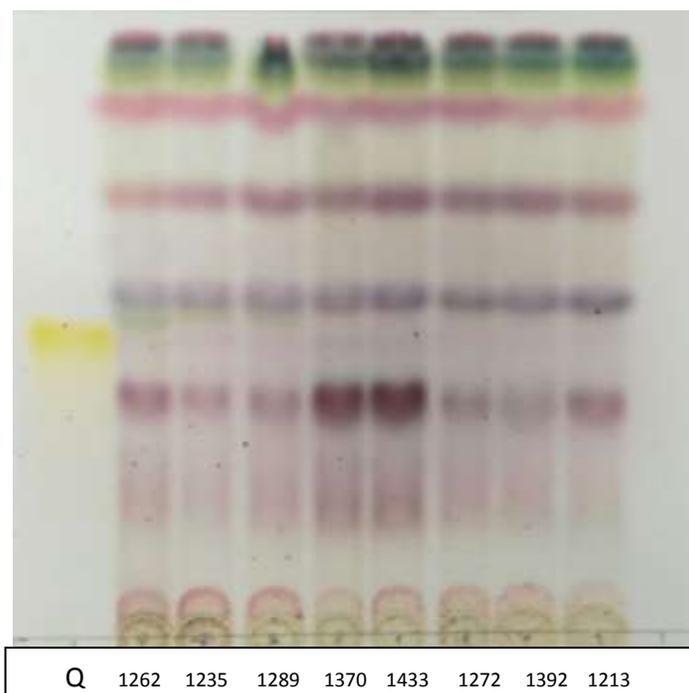


Figura 19. CCF para quercetina. Q: quercetina, *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213).

En la Figura 19 se muestra la CCF para el flavonoide quercetina, a partir de esta determinación se pudieron observar ciertas señales sobresalientes, sin embargo, el comportamiento cromatográfico del estándar de quercetina no muestra similitud ni con el Rf de las principales muestras ni con la coloración obtenida con el revelador anisaldehído, el cual es específico para este tipo de compuestos. Es posible que no exista la presencia de quercetina en las diferentes muestras de quelites debido a la diferencia de coloración obtenida.

- **Catequina**

Existen pocos estudios de la presencia de catequina en hojas de amaranto, Vysochina y col., reportaron en el 2012⁷⁴ la presencia de compuestos bioactivos en hojas y flores de amaranto, dentro de los compuestos reportados están flavonoles, catequinas, taninos y carotenos en 45 especies de *Amaranthus* L. presentándose en una concentración de 0-08-0.27% para hojas y 0.04-0.12% para flores.

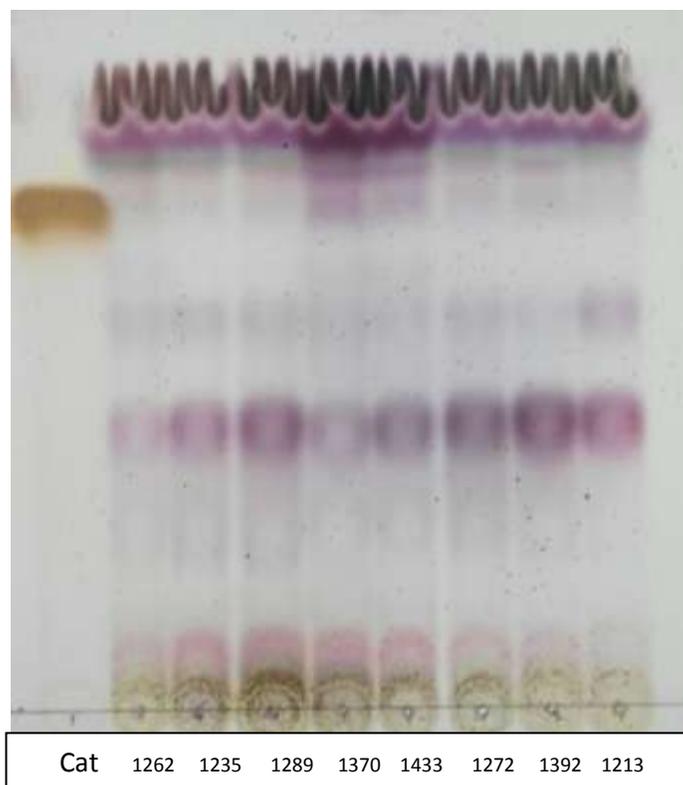


Figura 20. CCF para catequina. Cat: catequina, *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213).

En la Figura 20 se muestra la CCF para catequina, pertenece a la familia de los flavanoles. Se observó que la señal del estándar de catequina es similar en Rf con las señales presentes en las diferentes colectas de amaranto, particularmente las muestras *A. hybridus* L. (1370) y *A. hypochondriacus* raza azteca (1433) presentan una señal con mayor intensidad; a pesar de que el Rf es similar, la coloración con anisaldehído no es la misma entre las muestras y el estándar, lo que puede indicar que no existe la presencia de catequina en las muestras de quelites.

- **Rutina**

La rutina es de los flavonoides que se presentan más frecuentemente en las hojas de amaranto, existen diversos estudios que reportan su presencia en diferentes especies de *Amaranthus*, Kalinova y Dadakova reportan en el 2009⁷⁵ el contenido de rutina en diferentes partes de la planta de amaranto: hojas, tallos, flores y semillas para diferentes especies, los mayores valores se encontraron en la parte de la semilla (11-99 mg/kg de peso seco) seguido por la parte foliar (13-27 mg/kg peso seco), en esta investigación se reporta que la planta de amaranto puede ser una fuente importante de rutina.

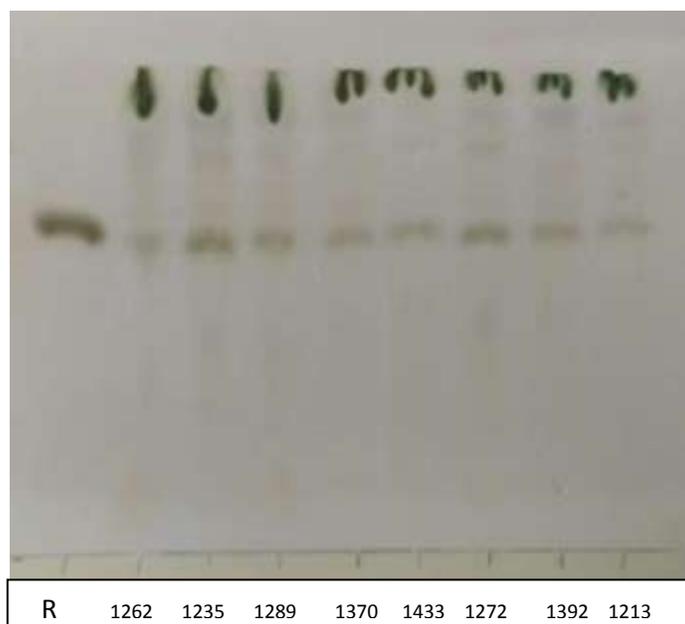


Figura 21. CCF para rutina. R: Rutina, *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213).

En la Figura 21 se muestra la CCF para la identificación de rutina, la rutina es parte del grupo de compuestos de los flavonoides y se observa que el Rf de las muestras coincide con el del estándar utilizado así como la coloración obtenida con el revelador cloruro férrico (específico para este tipo de compuestos), además de que el perfil de señales para todas las muestras fue similar, es posible la presencia de rutina en las hojas de amaranto. A continuación se muestra las placas cromatográficas correspondientes a la fracción de extracción con diclorometano.

3) Fracción lipídica

- Esteroles

Los reportes de los diferentes tipos de esteroides componentes de la planta de amaranto son muy antiguos ^{56,76-78}, la parte vegetal más estudiada es la semilla. Se ha demostrado que la familia *Amaranthaceae* presenta alto contenido de esteroides, se reporta la presencia de estigmasterol, ergosterol, stigmastenol y spinasterol en semillas con una concentración total de 0.35 mg / g de peso seco. En las hojas se ha reportado la presencia de campesterol, estigmasterol, 7-ergostenol, espinasterol y 7-estigmastenol, el compuesto mayoritario encontrado fue el espinasterol con una proporción del 52.4% del contenido total de esteroides ⁷⁹.

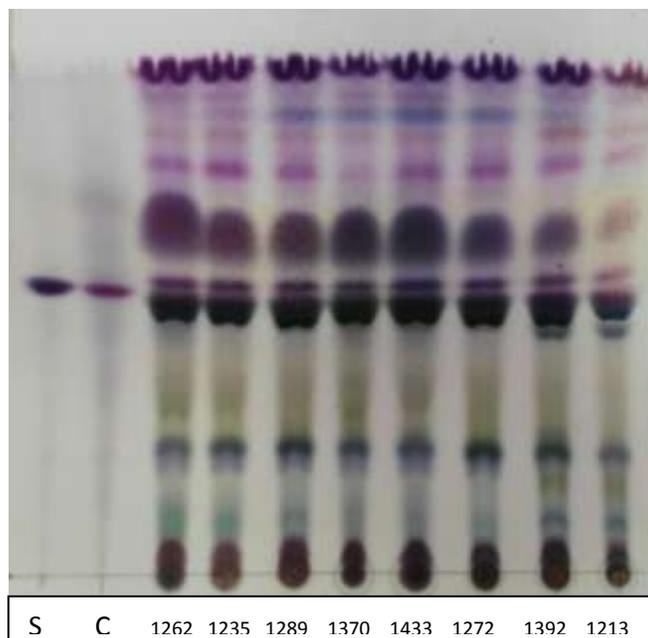


Figura 22. CCF para esteroides. S: estándar de estigmasterol, C: mezcla comercial de esteroides, *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213)

En la Figura 22 se muestra la CCF para esteroides usando estigmasterol (S) y una mezcla comercial de esteroides (C) a partir de la placa se pueden hacer dos observaciones principales donde el comportamiento cromatográfico de todos los extractos de las diferentes especies de *Amaranthus* fue similar y que el Rf de las diferentes muestras también es similar con los estándares utilizados, por lo tanto, es posible que exista presencia de esteroides en las muestras de quelites.

- **Escualeno**

En relación a la presencia de escualeno se ha indicado que es un recurso abundante en el aceite de hígado de tiburón (30-45% del total de aceite), sin embargo, debido a la dificultad de extracción, se han buscado fuentes vegetales alternativas, la planta de amaranto ha sido reportada como fuente potencial de escualeno. Diversos estudios enfocados a la semilla de esta planta muestran la presencia de escualeno, con una concentración de 2.4 a 8.0% del total de aceite, mayor comparado con otros aceites provenientes de otras fuentes vegetales. Debido a las características fáciles de cultivo de la planta de amaranto se plantea como fuente vegetal importante para la obtención de escualeno⁵⁵.

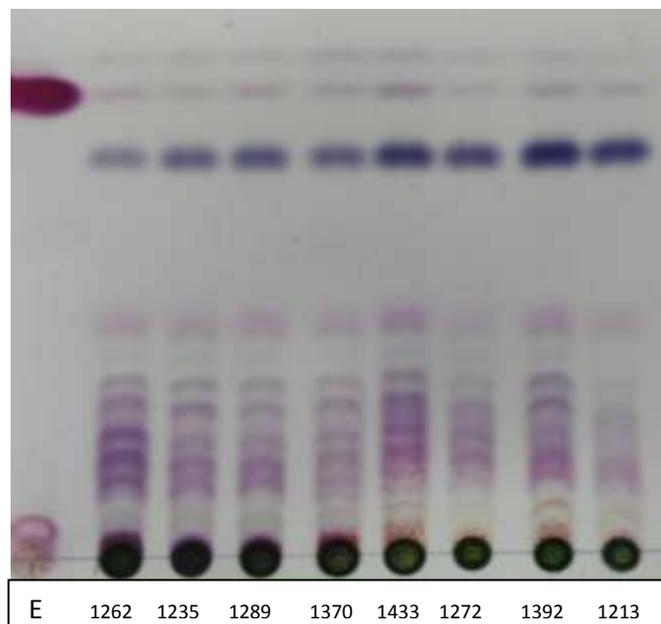


Figura 23. CCF para escualeno. E: escualeno, *A. hybridus* L. (1262), *A. hybridus* L. (1235), *A. cruentus* raza mexicana (1289), *A. hybridus* L. (1370), *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1392) y *A. spinosus* L. (1213)

En la Figura 23 la CCF para escualeno (E) se observa que las colectas de quelites muestran un Rf que coincide con el estándar indicando la posible presencia de este compuesto en todas las especies de hojas de amaranto.

8.2 Etapa 2. Cuantificación de compuestos por HPLC Y CG

A partir de la cuantificación de compuestos totales y determinación cualitativa por CCF, se identificaron los principales compuestos de interés amarantina, ácidos fenólicos, rutina y escualeno, con disponibilidad para ser aislados y caracterizados por técnicas como HPLC, CG y RMN.

8.2.1 Cuantificación de amarantina

La cuantificación de las betalaínas presentes en los extractos de amaranto se llevó a cabo a partir del establecimiento de la curva de calibración usando como estándar el extracto obtenido a partir de la purificación de las betalaínas representativas de la familia *Amaranthaceae*, amarantina e isoamarantina.

- **Purificación de estándar interno de amarantina**

La disponibilidad de estándares puros para la cuantificación de ciertos compuestos bioactivos es limitada, la venta de estándares de betalaínas comerciales se limita a la betacianina representativa del betabel (betanina). La betacianina representativa de la familia *Amaranthaceae* es la amarantina de la cual no se encontró un proveedor para hacer la cuantificación correspondiente.

Partiendo de este factor se vio la necesidad de realizar la purificación de la amarantina a partir de las hojas de una de las colectas de quelites: *A. cruentus* raza mexicana (1392) la cual mostró de los valores más altos de betalaínas totales y existía una mayor disponibilidad de muestra seca para ser utilizada en la purificación.

La purificación se llevó a cabo a partir de la extracción con una mezcla metanol:agua de las betalaínas, el primer paso para proceder con la purificación fue la eliminación de la clorofila con diclorometano. El extracto resultante fue concentrado y purificado por columna cromatográfica con la correspondiente recolección de fracciones separadas por color (punto 7.3.2.1: purificación del estándar de amarantina). Las fracciones colectadas fueron monitoreadas por placa cromatográfica de celulosa (Figura 24), aquellas que mostraron un Rf similar fueron agrupadas.

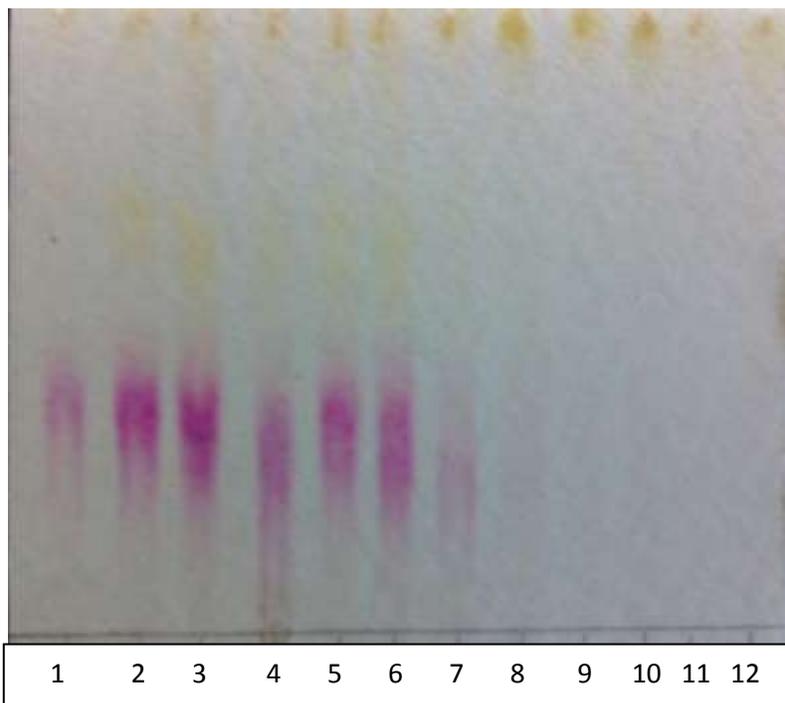


Figura 24. CCF de fracciones colectadas en columna para purificación de amarantina

Las fracciones que fueron agrupadas se enumeran como: 1-3, 4-6, 7-9 y 12-18 (fracción amarilla). La fracción de principal interés es la de 1-3, la cual tuvo un rendimiento de 0.2% al final de la purificación. Esta fracción fue analizada por HPLC y RMN para hacer su identificación.

Diversos estudios reportan algunos tipos de purificación establecidos para las betalaínas de la familia *Amaranthaceae*, algunos trabajos utilizan agua para la extracción de betalaínas pues es más eficiente para la obtención de estos compuestos, sin embargo, utilizar este disolvente acarrea proteínas y es difícil de concentrar, es por eso que la mayoría de los autores utilizan metanol al 80% por ser más fácil el manejo del extracto. Para la separación de betacianinas y betaxantinas se utiliza Sephadex LH-20 en columna y agua desionizada como eluyente^{28,66,70,80-82}. En la Figura 25 se muestra el gradiente de color reportado en Biswas y col., en el 2013⁸¹, el cual concuerda con el obtenido para este trabajo.

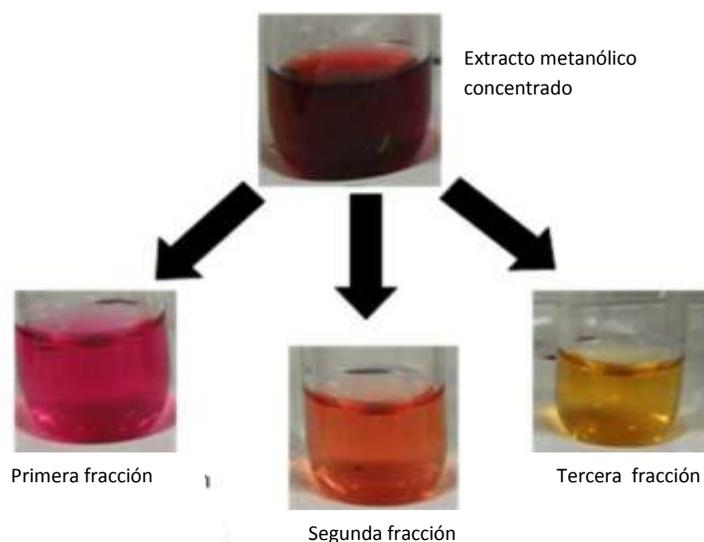


Figura 25. Fracciones con diferentes pigmentos recolectados en la columna con Shephadex LH-20⁸¹.

- **Identificación por RMN y HPLC**

La pureza de las fracciones 1-3 fue monitoreada por HPLC con el método reportado en Schliemann y col., en el 2001⁶⁶, se observa la presencia principalmente de dos señales (Figura 26), la primera con un tiempo de retención de 14.738 minutos (con un porcentaje de área de 61.15%) y la segunda con un tiempo de 15.574 (con un porcentaje de área de 34.89%).

La betalaína representativa de la familia *Amaranthaceae* es la amarantina, siendo la que se encuentra en mayor concentración en las diversas muestras estudiadas, el perfil cromatográfico reportado para las betalaínas de esta familia en orden de aparición de señales es el mismo en diversos estudios^{28,70,80,82,83} específicamente para el género *Amaranthus spp.* el perfil reportado es el mismo que para este trabajo, particularmente para el método de HPLC usado, los tiempos de

retención obtenidos fueron parecidos al obtenido en este estudio con 16.2 minutos para amarantina y 17.2 minutos para isoamarantina.

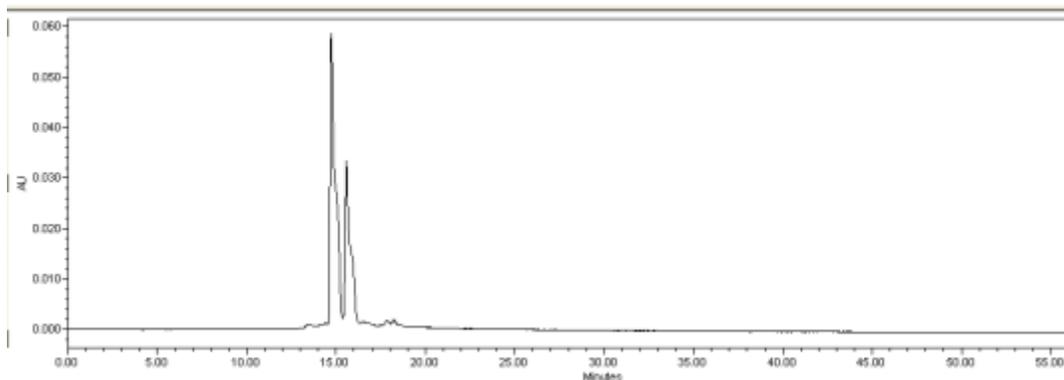


Figura 26. Cromatograma para purificación de Fracciones 1-3

La fracción 1-3 con los picos 1 y 2 identificados en HPLC fue también identificada por RMN con el disolvente reportado como el más adecuado para evitar la hidrólisis de la betacianina (D_2O)⁸⁴. Existen pocos reportes referentes a la resonancia de las betalaínas, la betacianina más estudiada es la betanina proveniente del betabel, el esqueleto estructural es muy parecido al de la amarantina por lo que los datos reportados para esta molécula, desplazamiento químico (δ) y constante de acoplamiento (J) se tomaron como base para asignar las señales en este trabajo⁸⁴⁻⁸⁶.

En el Cuadro 25 se observan los desplazamientos asignados para cada carbono tanto para 1H como para ^{13}C , en la Figura 27 se observa el número del carbón asignado de acuerdo a la estructura de la amarantina,

el acoplamiento de los sistemas de spin 1H de H-2 con H-3a/b, H-11 con H-12 y H-14a/b con H-15 del aglicón betanidina, así como los acoplamientos de la glucosa H-1'-6' y el ácido glucurónico H-1''-5'' fueron confirmados por el experimento 2-D COSY.

Los desplazamientos asignados en ^{13}C fueron confirmados con los carbonos ligados directamente a hidrógeno mediante el experimento 2-D HSQC y para observar el acoplamiento a 2 y 3 enlaces de distancia principalmente para el caso de la glucosa y el ácido glucurónico se utilizó el experimento 2-D HMBC. En el Anexo 3 se muestran los espectros de 1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC con las señales asignadas para la molécula de amarantina.

Cuadro 25. Datos de ^1H y ^{13}C para amarantina.

No. Carbono	^1H RMN δ [ppm], mult, J [Hz]	^{13}C RMN δ [ppm]
2	4.90, d, 8.2	65.34
3 a/b	3.59, dd, 10.1; 17.6 3.00, dd, 10.0; 14.1	33.57
4	7.16, s	114.96
5		143.57
6		146.33
7	7.08 s	100.09
8		138.66
9		124.65
10		177.02
11	7.98, d, 8.2	144.36
12	5.25, dd, 10.8	105.76
13		117.91
14	3.26, d, 10.0 2.93-2.98, m	28.47
15	4.10-05, m	53.91
16		-
17		-
18	6.61, s	104.82
1'	4.80, d, 4.4	101.28
2'	3.47 (sobreposición)	-
3'	3.43 (sobreposición)	73.70
4'	3.38 (sobreposición)	69.54
5'	3.44 (sobreposición)	74.99
6'	3.79, dd, 7.3; 16.4 3.72, m	60.3
1''	4.96, m	
2''	3.52 (sobreposición)	
3''	3.48 (sobreposición)	
4''	3.46 (sobreposición)	
5''	3.49 (sobreposición)	

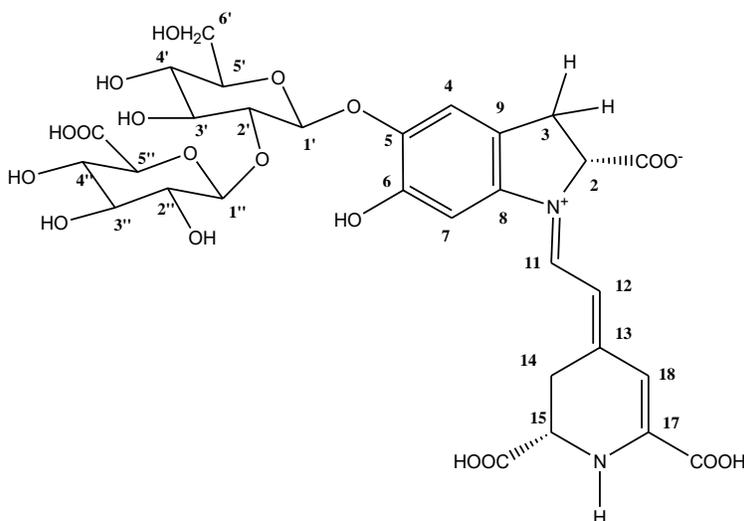


Figura 27. Numeración de carbonos para la molécula de amarantina

- **Extracción de betalainas**

La extracción de betalainas en este trabajo se realizó con metanol al 80%, posteriormente fue filtrado para la determinación directa por la técnica de HPLC. Los reportes de extracción de betalainas, emplean soluciones acuosas, alcohólicas en diferentes concentraciones y acidificadas. Se reporta que las soluciones con mayor rendimiento de extracción son aquellas que usaron ácido cítrico al 0.2%, ácido ascórbico al 0.1% y una solución acuosa de etanol al 20% y ácido ascórbico al 0.5% ^{87,88}.

- **Cuantificación de amarantina**

La cuantificación de amarantina se llevó a cabo a partir del establecimiento de la curva de calibración con el extracto purificado de amarantina identificado, tomando en cuenta tanto el tiempo de retención como el porcentaje de área (que se tomó como porcentaje de pureza) para el cálculo de la concentración y la curva de calibración para amarantina (Anexo 2, Tabla 3). A continuación se presentan los valores determinados de amarantina en las diferentes colectas de quelites de la familia *Amaranthaceae*.

Cuadro 26. Cuantificación de amarantina para las diferentes colectas de quelites (μg amarantina/ g de muestra)

A.	A.	A.	A.	A.	A.	A.	A.
<i>hybridus</i>	<i>hybridus</i>	<i>hybridus</i>	<i>cruentus</i>	<i>cruentus</i>	<i>hypoch.</i>	<i>hypoch.</i>	<i>spinosus</i>
L. 1235	L. 1262	L. 1370	mexicana	mexicana	azteca	azteca	L. 1213
			1289	1392	1433	1272	
4.41	4.51	12.24	4.55	225.43	37.37	20.43	132.03
± 0.13	± 0.33	± 0.22	± 0.14	± 11.53	± 6.33	± 6.22	± 2.74

Del Cuadro 26 se observan los valores para amarantina determinados a partir de HPLC y el estándar purificado. El análisis estadístico establece una diferencia significativa entre los valores de las diferentes colectas (Anexo 1, Tabla10), la prueba múltiple de rangos establece que no existe diferencia significativa sólo para los valores más bajos de amarantina (Anexo 1 Tabla 10.1) para las siguientes colectas: *A.hybridus* L. (1235, 1262 y 1370) y *A. cruentus* raza mexicana (1289). De especial interés es el valor de amarantina para la colecta de *A.hybridus* L. (1370) pues fue la muestra con mayor contenido de betalaínas totales y betacianinas (punto 8.1.3: betalaínas totales) sin embargo al ser un método poco sensible, es posible que la presencia de otros pigmentos como la clorofila pudieran interferir con la medición espectrofotométrica. El valor más alto de amarantina lo presentó *A. cruentus* raza mexicana (1392) misma muestra de donde se purificó el estándar.

Los valores presentes en la literatura para la cantidad de amarantina presente en las diferentes especies de *Amaranthus spp.* se reporta como porcentaje con base en el contenido total de pigmento presente (en forma de compuestos tipo amarantina totales) y es calculado a partir del coeficiente de absortividad molar reportado en Cai y col., en el 2001 ³². A continuación se presentan los valores reportados en la literatura para amarantina

Cuadro 27. Contenido de amarantina reportado en la literatura.

Especie	Composición de amarantina (%)	Contenido total de betalaínas (mg compuestos tipo amarantina totales/g peso fresco)	Referencia
<i>A. hybridus</i>	96.1	0.76	Cai y col., 2001 ³²
<i>A. hypochondriacus</i>	95.5	1.08	
<i>A. spinosus</i>	94.9	0.26	

En el Cuadro 27 se observan los valores de amarantina presente en las especies de amaranto usadas en este trabajo, el rango de contenido de amarantina va de 246-1031 µg de amarantina/g de peso fresco, el máximo obtenido en este trabajo fue de 225.43 µg de amarantina/ g de peso seco.

La biosíntesis de la amarantina está directamente relacionada con el metabolismo de nitrógeno en la planta, es uno de los intermediarios en la ruta metabólica para biosíntesis de compuestos nitrogenados. A partir de la ruta de biosíntesis de tirosina y fenilalanina se produce el ácido *trans*-cinámico y sus derivados hidroxilo y metoxilados. Estos derivados se encuentran al inicio de la ruta metabólica en la síntesis de flavonoides y polifenóles condensados como los taninos. También derivan en los alcoholes coniferílico y sinapílico y el ácido *p*-cumárico los cuales son componentes estructurales para la formación de lignina. El incremento en el gasto de los precursores tirosina y fenilalanina en la ruta biosintética que inicia con L-tirosina sigue con la formación de dihidroxifenilalanina (DOPA) y finalmente con la síntesis de la amarantina limitaría la síntesis de lignina. Se reporta una relación entre la coloración de las hojas de amaranto y la disminución de los niveles de celulosa y lignina provocando que la densidad foliar también disminuya ³¹.

8.2.2 Cuantificación de ácidos fenólicos

La cuantificación e identificación específica de ácidos fenólicos presentes en hojas de quelites se llevó a cabo en esta sección, se realizó a partir de la técnica de HPLC y comparación de tiempos de retención con estándares comerciales.

- **Extracción de ácidos fenólicos**

La técnica de extracción utilizada generalmente se enfoca a la localización en el tejido vegetal de los ácidos fenólicos, muchos de los derivados de ácidos fenólicos presentes en las plantas se encuentran en vacuolas y son fácilmente extraídos con solventes orgánicos, también están presentes aquellos ligados a carbohidratos y proteínas insolubles ligados a la matriz celular.

En este trabajo se utilizó una extracción alcalina para posteriormente llegar a pH 3-4 con ácido concentrado. Usualmente la presencia de los ácidos fenólicos se da en forma simple como en forma de polifenoles, la técnica más usada para el fraccionamiento de estos compuestos está basada en la diferencia de acidez, el pKa a del protón fenólico es aproximadamente de 10 mientras que el valor de pKa del protón de los ácidos carboxílicos está entre 4 y 5, el tratamiento con NaOH se da para remover compuestos neutros, la posterior acidificación hace posible la extracción de los ácidos fenólicos y la extracción con acetato de etilo hace posible la remoción de flavonoides ³⁹.

- **Cuantificación de ácidos fenólicos**

La cuantificación de ácidos fenólicos se llevó a cabo a partir del establecimiento de las curvas de calibración con estándares comerciales y comparando los tiempos de retención de estándares con los tiempos mostrados en las diferentes colectas de quelites por el método de HPLC. Los ácidos que fueron rastreados son: gálico, dihidroxibenzoico, clorogénico, caféico, cumárico y ferúlico. A continuación se muestran los ácidos identificados en las diferentes colectas

Cuadro 28. Presencia de ácidos fenólicos en las diferentes colectas de quelites.

Colecta de quelite /Ácido fenólico	Ác. Gálico	Ác. Dihidroxibenzóico	Ác Clorogénico	Ác Caféico	Ác. Cumárico	Ác. Ferúlico
Tiempo de retención (min)	4.2	5.8	7.3	9.2	11.8	12.8
<i>A. hybridus</i> L. 1235	+	+	+	+	+	+
<i>A. hybridus</i> L. 1262	+	-	+	+	+	+
<i>A. hybridus</i> L. 1370	-	+	-	+	+	-
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1289	+	-	+	+	-	-
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1392	+	-	-	+	-	-
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1433	+	-	-	+	+	-
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1272	+	+	+	+	+	-
<i>A. spinosus</i> L. 1213	+	+	+	+	+	+

Como se observa en el Cuadro 28 la presencia de los ácidos fenólicos examinados en este trabajo es diversa, los ácidos gálico y caféico muestran una presencia casi constante en todas las muestras de quelites, al contrario del ácido ferúlico de que se presenta en sólo tres muestras. Esto va en diferencia con lo encontrado en la sección 8.1.4 para la CCF correspondiente a los ácidos fenólicos dónde no se observan señales evidentes para la presencia de ácido caféico pero si para ácido ferúlico.

La comparación del tiempo de retención de las muestras de quelite con estándares comerciales hizo posible determinar la presencia de ciertos ácidos fenólicos, sin embargo, debido a las bajas concentraciones encontradas no todos pudieron ser cuantificados. A continuación se presenta la tabla con los datos de concentración calculados a partir del establecimiento de las curvas de calibración (Anexo 2, Tabla 4).

Cuadro 29. Cuantificación de ácidos fenólicos para las diferentes colectas de quelites.

Colecta de quelite/ Ácido fenólico ^a	Ác. Gálico	Ác. Dihidroxibenzóico	Ác. Caféico	Ác. Ferúlico
<i>A. hybridus</i> L. 1235	103.07 ±53.18	N. C.	203.05 ±79.12	113.34 ±29.21
<i>A. hybridus</i> L. 1262	N. C. ^b	N. P.	802.61 ±92.12	136.65 ±14.44
<i>A. hybridus</i> L. 1370	N. P. ^c	31.29 ±8.08	99.91 ±0.76	N. P.
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1289	N. C.	N. P.	218.51 ±58.53	N. P.
<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1392	N. C.	N. P.	1069.42 ±29.11	N. P.
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca 1433	269.57 ±45.98	N. P.	148.85 ±38.82	N. P.
<i>A. hypochondriacus</i> raza azteca1272	N. C.	N. C.	373.64 ±31.14	N. P.
<i>A. spinosus</i> L. 1213	N.C.	47.71 ±2.02	1284.80 ±102.86	171.73 ±22.08

^a (µgÁcido/g_{mtra}), ^b N.C. No cuantificable, ^c N.P. no presente.

El Cuadro 29 muestra los valores de concentración para los ácidos fenólicos determinados mediante el método de HPLC, se observa que los ácidos gálico, dihidroxibenzóico, y ferúlico no muestran una presencia constante en todas las colectas. El ácido con menor concentración es el ácido dihidroxibenzóico, presente solamente en *A. hybridus* L. (1370) y *A. spinosus* L. (1213). Por otro lado, el ácido caféico es el compuesto de mayor concentración y presente para todas las colectas, la mayor concentración la muestra *A. spinosus* L. (1213) con aproximadamente 1 mg de ácido/g de muestra. El ácido caféico es precursor de los ácidos ácido ferúlico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico, la enzima ácido cafeico-*O*-metiltransferasa cataliza la transformación a ácido ferúlico todos estos compuestos son pilares significativos en la lignina⁸⁹. Puede ser posible que los quelites, al ser follaje joven (tierno), la estructura que da rigidez a las hojas aun no llegue a la síntesis final como lignina, y los precursores como el ácido caféico estén presentes en una concentración importante.

Como se señaló anteriormente, la diversidad de ácidos fenólicos estudiados es grande, a continuación se muestran los valores de los ácidos estudiados en este trabajo que ya han sido reportados previamente en la planta de amaranto

Cuadro 30. Valores reportados en la literatura de ácidos fenólicos en la planta de amaranto.

Especie de amaranto/ Ácido fenólico	Ác. Gálico (mg/ 100 g PS ^a)	Ác. Dihidroxibenzóico (mg/ 100 g PS ^a)	Ác. Caféico (µg /g PF ^b)	Ác. Ferúlico (mg/ 100 g PS ^a)	Referencia
<i>A. hypochondriacus</i> (hojas)	12.36 ±0.45	3.50 ±0.16	-	0.35 ±0.02	Hongyan y col., 2015 ²³
<i>A. caudatus</i> (hojas)	10.95 ±0.39	3.19 ±0.15	-	0.44 ±0.02	Hongyan y col., 2015 ²³
<i>A. caudatus</i> (grano)	0.85 ±0.01	-	-	8.32 ±0.70	Repo-Carrasco- Valencia y col., 2010 ⁴¹
<i>A. cruentus</i> var. azteca (brote)	370 ^c	-	-	-	Pásko y col., 2008 ⁴⁶
<i>A. hypochondriacus</i> var. New Aztec (hojas)	5.9 ±0.5 ^d	-	0.3 ±0.2	2.9 ±0.6 ^d	Khanam y Oba, 2013 ²²

^a P.S. peso seco, ^b P. F. peso fresco, ^c mg/kg peso seco, ^d µg/g peso fresco

En el Cuadro 30 se puede observar los valores publicados en la literatura para los ácidos fenólicos estudiados en este trabajo, Hongyan y col., Pasko y col., y Repo-Carrasco-Valencia y col.^{23,41,46}, reportan valores de los ácidos gálico, dihidroxibenzóico, y ferúlico, entre otros; al comparar los valores obtenidos por estos autores, se encuentra que estos van en un intervalo de 3-1000 µg de ácido/ g de muestra y los menores valores los presenta la zona del grano. Así los valores reportados en la literatura se encuentran dentro de la misma magnitud que los obtenidos en este trabajo, es importante puntualizar que la presencia de ácido caféico es limitada y escasa en estos trabajos.

8.2.3 Cuantificación de rutina

La determinación de rutina se realizó partiendo de la identificación parcial en CCF (sección 8.1.4), la cuantificación se llevó a cabo por HPLC comparando con un estándar comercial.

- **Extracción de rutina**

El método de extracción seguido fue sonicación en una solución metanólica para posteriormente cuantificar sin realizar algún otro paso de purificación. Es reportado que la extracción asistida por sonicación da mejores rendimientos en comparación con otros métodos (un 50% en comparado con reflujo). El uso de metanol como disolvente de extracción es reportado como más eficiente comparado con el medio acuoso debido a la estabilidad brindada por el metanol frente al fenómeno llamado cavitación acústica producido por las ondas ultrasónicas. Los radicales libres generados por las burbujas de cavitación pueden producir efectos químicos indeseados en la extracción de rutina como su oxidación, se reporta que realizar el proceso de sonicación en medio acuoso promueve la formación de radicales hidroxilo altamente reactivos⁴³.

- **Cuantificación de rutina**

La cuantificación de rutina se realizó a partir del establecimiento de la curva de calibración con el estándar comercial (Anexo 2, Tabla 5) y la comparación con el tiempo de retención de la señal en las muestras de quelites, a continuación se muestra la tabla con los valores de concentración de rutina en las diferentes colectas de quelites.

Cuadro 31. Cuantificación de rutina en las diferentes colectas de quelites (mg rutina/g muestra).

<i>A. hybridus</i> L. 1235	<i>A. hybridus</i> L. 1262	<i>A. hybridus</i> L. 1370	<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1289	<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1392	<i>A. hypoch.</i> raza azteca 1433	<i>A. hypoch.</i> raza azteca 1272	<i>A. spinosus</i> L. 1213
0.673	0.413	0.359	0.714	0.620	0.556	0.720	0.597
±0.04	±0.012	±0.046	±0.044	±0.028	±0.065	±0.024	±0.025

El Cuadro 31 muestra los valores de concentración de rutina para cada una de las colectas de quelites, los valores más altos de rutina los muestran las colectas *A. hypochondriacus* raza azteca (1272), *A. cruentus* raza mexicana (1289) y *A. hybridus* L. (1235), de acuerdo al análisis estadístico, existe una diferencia significativa entre todas las colectas de quelites (Anexo 1, Tabla 11), sin embargo, la prueba múltiple de rangos indicó que no existe una diferencia significativa entre las colectas de quelites con mayores valores de concentración de rutina (Anexo 1, Tabla 11.1).

Se observa en el Cuadro 32 que los valores reportados en la literatura principalmente en la parte foliar de la planta de amaranto

Cuadro 32. Valores reportados en la literatura de rutina para la planta de amaranto.

Variedad de amaranto	Concentración de rutina	Referencia
<i>A. hypochondriacus</i> (hojas)	333.25 ±10.87 ^a	Hongyan y col., 2015 ²³
<i>A. caudatus</i> (hojas)	264.21 ±5.57 ^a	Hongyan y col., 2015 ²³
<i>A. hypochondriacus</i> (hojas)	13 950 ± 566 ^b	Kalinova y Dadakova, 2009 ⁷⁵
<i>A. hybridus</i> (hojas)	27 500 ±1 626 ^b	Kalinova y Dadakova, 2009 ⁷⁵
<i>A. cruentus</i> var. azteca (brote)	690 ^b	Pásko y col., 2008 ⁴⁶

^a mg/100g de peso seco, ^b mg/kg peso seco.

Las concentraciones van del rango de 2-30mg de rutina/g de muestra, estos son mucho mayores que los obtenidos para este trabajo donde el rango de valores va de 0.3-0.7 mg de rutina/g de muestra.

El contenido de rutina varía dependiendo de la parte de la planta o de la etapa de desarrollo del cultivo, así Hongyan y col., reportó en el 2015 ²³ que la concentración de rutina es mayor en la parte foliar de la planta de amaranto, comparado con semillas, tallos, flores y brotes.

Kalinova y col., publicaron en el 2009 ⁷⁵ que el contenido de rutina en hojas depende del estado de maduración en el que se encuentren, la tendencia indica que entre mayor sea el estado de maduración el contenido de rutina puede aumentar. Es posible que al encontrarse las hojas de amaranto en una etapa temprana de maduración (definida como hojas tiernas) el contenido de rutina no ha llegado a su máxima producción a pesar de ser hojas.

8.2.4 Cuantificación de escualeno

La cuantificación de escualeno también se realizó a partir de la evidencia mostrada por las señales comparadas con el estándar en la CCF (sección 8.1.4). La cuantificación se llevó a cabo por la técnica de CG comparando con un estándar comercial.

- **Extracción de escualeno**

El método de extracción seguido para la determinación de escualeno fue la extracción con un disolvente no polar (hexano) para posteriormente ser sometido a un proceso de saponificación y poder realizar la cuantificación. La extracción con un disolvente no polar permite obtener el aceite vegetal de las hojas, dentro de los métodos más usados para el fraccionamiento de los aceites vegetales se encuentra la saponificación, que es un método que permite una purificación parcial de los compuestos presentes en la fracción grasa, la saponificación es la reacción de un éster y un hidróxido alcalino obteniéndose la sal alcalina del ácido orgánico y un alcohol, aquellos compuestos que no sean afectados por esta reacción se les llama lípidos insaponificables, así es como se puede exponer al escualeno de la matriz foliar. Es reportado que el escualeno en la planta de amaranto se puede extraer fácilmente a partir de una destilación al vacío, sin embargo, se puede obtener una extracción más eficiente y con mayor rendimiento con la reacción de saponificación. En un proceso de purificación, después de la saponificación, el contenido de escualeno se incremento de un 4.2% a un 43.3% del total de aceite ⁹⁰.

- **Cuantificación de escualeno**

La cuantificación de escualeno se realizó a partir del establecimiento de curvas de calibración con el estándar comercial (Anexo 2, Tabla 6) y la comparación del tiempo de retención de los extractos saponificados de las hojas de amaranto con el tiempo de retención mostrado por un estándar con CG, a continuación se muestran los resultados de la cuantificación de escualeno

Cuadro 33. Cuantificación de escualeno en las diferentes colectas de quelites (μg de escualeno/g de muestra)

<i>A. hybridus</i> L. 1235	<i>A. hybridus</i> L. 1262	<i>A. hybridus</i> L. 1370	<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1289	<i>A. cruentus</i> raza mexicana 1392	<i>A. hypoch.</i> raza azteca 1433	<i>A. hypoch.</i> raza azteca 1272	<i>A. spinosus</i> L. 1213
1.73	3.01	1.62	2.97	1.90	2.99	1.77	2.91
± 0.06	± 0.05	± 0.11	± 0.18	± 0.10	± 0.22	± 0.09	± 0.18

En el Cuadro 33 se observan los valores correspondientes a la determinación de escualeno de las diferentes colectas de amaranto, el análisis estadístico establece que existe diferencia significativa entre las colectas (Anexo 1 Tabla 12), la prueba múltiple de rangos (Anexo 1 Tabla 12.1) agrupa las diferentes colectas en dos grupos donde no existe diferencia significativa: *A. hybridus* L. (1370), *A. hybridus* L. (1235), *A. hypochondriacus* raza azteca (1272) y *A. cruentus* raza mexicana (1392) para los valores más pequeños de concentración de escualeno. La muestra de mayor concentración es *A. hybridus* L. (1262), sin embargo, los valores de esta colecta no muestran una diferencia significativa con *A. hypochondriacus* raza azteca (1433), *A. cruentus* raza mexicana (1289) y *A. spinosus* L. (1213). A continuación se muestra la tabla de valores reportados de escualeno en la planta de amaranto.

Cuadro 34. Valores reportados en la literatura para escualeno

Variedad de amaranto	Concentración de escualeno	Referencia
<i>A. hypochondriacus</i> (grano)	0.76 ^a	He y col., 2002 ⁹¹
<i>A. hybridus</i> (semillas)	1.73 ^b	He y Corke, 2003 ⁵⁵
<i>A. hybridus</i> (hojas)	0.46 ^c	He y Corke, 2003 ⁵⁵

^a g/ kg de grano, ^b mg/g semilla, mg/10g peso seco.

Los estudios reportados de escualeno en la planta de amaranto se enfocan principalmente al grano, por ser la parte de la planta con un mayor contenido de lípidos dadas sus características fisiológicas, es de esperarse que el mayor contenido de escualeno sea mucho mayor. Refiriendo a los valores reportados para la parte foliar por He y Corke en el 2003⁵⁵ es mayor: un promedio de 2.36 μg de escualeno/g de peso seco comparado con 46 μg de escualeno/g de peso seco.

He, H. en el 2003⁹² estudió el contenido de amaranto en hojas en diferentes etapas de crecimiento de la planta, no encontró evidencias de que exista relación entre el contenido de escualeno en hojas y la etapa de crecimiento fisiológico de la planta, reporta que mientras ciertas especies muestran una clara tendencia que relacionan estos dos parámetros, otras no. Se indica que el contenido de amaranto (si es que se pretende su uso como fuente de escualeno) dependerá tanto de la especie como de la fenología.

9. Conclusiones

El estudio de compuestos bioactivos presentes en los quelites de la familia *Amaranthaceae* representa una herramienta valiosa para resaltar la importancia de este alimento como componente esencial de la dieta en las comunidades rurales y escasamente en las urbanas, esta investigación se une con reportes previos acerca de la botánica, etnobotánica y composición nutrimental para resaltar el papel que ha tenido este alimento en México.

Este trabajo se realizó eligiendo, de manera inicial, el método de secado más adecuado para la mejor conservación de los dos tipos de compuestos más importantes; la liofilización fue el proceso que dio los valores más altos en las determinaciones de fenoles y betalaínas totales. Esta técnica fue la usada para la conservación de todas las muestras de hojas de las diferentes colectas.

Las determinaciones de compuestos totales mostraron una diferencia significativa entre todas las colectas para betalaínas (0.38-1.30 mg/ g muestra seca, ms), betacianinas (0.188-0.672 mg/ g ms) y betaxantinas (0.195-0.631 mg/ g ms) estos valores son mayores a los previamente reportados, indicando que ciertas colectas pueden ser una fuente importante de betalaínas. Se mostraron cantidades de clorofilas (1.70-3.28 mg/ g ms), carotenos (139.48-441.72 µg/ g ms) y fenoles (8.06-12.92 mg/ g ms) con diferencia significativa entre las colectas, los valores obtenidos en este trabajo coinciden con los reportado por otros autores. No se observó diferencia significativa en los valores de flavonoides totales (6.85-8.43 mg/ g ms) y coinciden con los valores en otros trabajos publicados. El estudio de los grupos de compuestos bioactivos totales da un panorama general de la composición de las diferentes especies de amaranto presentes en la Sierra Norte de Puebla.

La cromatografía en capa fina permitió identificar ciertos compuestos, rutina, esteroides y escualeno en todas las colectas de quelites analizadas, investigaciones previas ya habían reportado la presencia de estos compuestos en hojas de amaranto.

Se estableció la presencia de compuestos específicos: amarantina (4.41-225.43 µg/ g ms), el intervalo de concentraciones es amplio en las diferentes especies analizadas, la colecta con mayor contenido de amarantina (1392) es comparable con otras especies *Amaranthus* previamente reportadas. La concentración de ácidos fenólicos tiene un intervalo de concentración de 47.71-1284.80 µg/ g ms de diferentes ácidos, el ácido más abundante fue el ácido caféico (presente en todas las colectas) el cual es reportado como escaso y poco presente en otras especies de amaranto. La rutina se presentó en una concentración de 0.359 a 0.72 mg/ g ms mostrando un contenido por debajo de los reportados para diversas especies. De escualeno se presentaron concentraciones de 1.73 a 3.01 µg/ g muestra seca, los estudios de escualeno son enfocados principalmente al grano, pero se reporta que la concentración depende tanto de la etapa fisiológica como de la especie.

En la zona de la Sierra Norte de Puebla existe una gran diversidad dentro de las especies del género *Amaranthus*, se presenta una continua domesticación de los quelites, los valores de los

distintos grupos de compuestos presentes en las colectas no mostraron una tendencia similar entre las especies iguales. Debido a su fácil cultivo y manejo ciertas colectas pueden ser de interés por su concentración de compuestos bioactivos.

10. Perspectivas

Realizar estudios de purificación de amarantina para la obtención de espectros de resonancia magnética nuclear con elucidación total de la estructura.

Establecer un estudio de etapa fisiológica de los compuestos bioactivos presentes en las hojas de amaranto monitoreando su concentración.

Establecer un estudio para la optimización de la extracción de las betacianinas presentes en las hojas de amaranto.

11. Referencias

1. Bye, R. & Linares, E. Los Quelites, Plantas Comestibles de México Una reflexión sobre intercambio Cultural. *Biodiversitas* **31**, 11–14 (2000).
2. Bye, R. & Linares, E. in *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria* (eds. Castro-Lara, D., Mera-Ovando, L. M. & Bye, R.) 215 (UNAM-SNICS-SINAREFI, 2011).
3. Castro-Lara, D., Basurto-Peña, F. & Bye, R. in *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria* (eds. Castro-Lara, D., Mera-Ovando, L. M. & Bye, R.) 215 (UNAM-SNICS-SINAREFI, 2011).
4. Centro de Investigación en Geografía y Geomática 'Ing. Jorge L. Tamayo'. Sistema integrado de aprovechamiento de la milpa. 2 at <http://mapas.centrogeo.org.mx/ciberatlas/lacandona/mayalacandon/sisteaprovecha_2.htm>
5. SINAREFI. Red quelite. 1 at <http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_quelite.html>
6. McClung de Tapia, E., Martínez Yrizar, D., Ibarra Morales, E. & Adriano Morán, C. C. Los orígenes prehispánicos de una tradición alimentaria en la cuenca de México. *An. Antropol.* **48**, 97–121 (2014).
7. Mapes, C., Basurto, F. & Bye, R. Ethnobotany of Quintonil: Knowledge, Use and Management of Edible Greens *Amaranthus spp.* (*Amaranthaceae*) in the Sierra Norte de Puebla, México. *Econ. Bot.* **51**, 293–306 (1997).
8. Basurto-Peña, F. in *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria* (eds. Castro-Lara, D., Mera-Ovando, L. M. & Bye, R.) 215 (UNAM-SNICS-SINAREFI, 2011).
9. Mapes-Sánchez, C., Basurto-Peña, F. & Bye, R. in *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria* (eds. Castro-Lara, D., Mera-Ovando, L. M. & Bye, R.) **1**, 215 (UNAM-SNICS-SINAREFI, 2011).
10. Espitia-Rangel, E. *et al.* *Conservación y uso de los recursos genéticos de amaranto en México.* (SINAREFI-INIFAP-UNAM, 2010).
11. Mapes-Sánchez, C., Basurto-Peña, F. & Díaz-Ortega, A. *Diversidad de 'quintoniles' (Amaranthus spp.) en la Sierra Norte de Puebla, México.* (SAGARPA, 2013).
12. Mapes-Sánchez, C., Díaz-Ortega, A. & Blancas, J. in *Amaranto: Ciencia y Tecnología* (ed. Espitia-Rangel, E.) 183–201 (INIFAP/SINAREFI, 2012).
13. Mapes-Sánchez, C. in *Plantas, Cultura y Sociedad Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI* (eds. Rendón-Aguilar, B., Rebollar-Domínguez, S., Caballero-Nieto, J. & Martínez-Alfaro, M. A.) 317 (Universidad Autónoma Metropolitana, Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, 2001).

14. Akubugwo, I. E., Obasi, N. A., Chinyere, G. C. & Ugbogu, A. E. Nutritional and chemical value of *Amaranthus hybridus* L. leaves from Afikpo, Nigeria. *African J. Biotechnol.* **6**, 2833–2839 (2007).
15. Kwenin, W. K. J. ;, Wolli, M. & Dzomeku, B. M. Assessing the nutritional value of some African indigenous green Leafy Vegetables in Ghana. *J. Anim. Plant ...* **10**, 1300–1305 (2011).
16. Shukla, S., Pandey, V., Pachauri, G. & Dixit, B. S. Nutritional contents of different foliage cuttings of vegetable amaranth. *Plant Foods Hum. Nutr.* **58**, 1–8 (2004).
17. Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., Vioque, C. M. J. & Familia, A. Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas Y Aceites* **58**, 49–55 (2007).
18. Lorenz, K. & Wright, B. Phytate and Tannin content of amaranth. *Food Chem.* **14**, 27–34 (1984).
19. Prakash, D. & Pal, M. Nutritional and Antinutritional Composition of Vegetable and Grain Amaranth Leaves. *J. Sci. Food Agric.* **57**, 573–583 (1991).
20. Biesalski, H.-K. *et al.* Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition* **25**, 1–4 (2009).
21. Dillard, C. J. & German, J. B. Review Phytochemicals : nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1744–1756 (2000).
22. Khanam, U. K. S. & Oba, S. Bioactive substances in leaves of two amaranth species, *Amaranthus tricolor* and *A. hypochondriacus*. *Can. J. Plant Sci.* **93**, 47–58 (2013).
23. Hongyan, L. *et al.* Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed , leaf , sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. *J. Food Compos. Anal.* **37**, 75–81 (2015).
24. Azeredo, H. Betalains: properties, sources, applications, and stability- a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2365–2376 (2009).
25. Marañón-Ruíz, V. F., Rizo de la Torre, L. del C. & Chiu-Zarate, R. Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Uv-Vis y barrido en Z. *Superf. y Vacío* **24**, 113–120 (2011).
26. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Betalain Stability and Degradation- Structural and Chromatic Aspects. *J. Food Sci.* **71**, 41–50 (2006).
27. Cabello, I. & Lock, O. in *Antocianos y Betalaínas Colorantes Naturales de Aplicación Industrial* (eds. Muñoz, O. & Maldonado-Cid, S.) 253 (Programa Iberoamericano de Ciencia Y tecnología para el Desarrollo (CYTED) y la Comisión Nacional Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT), 2003).
28. Cai, Y.-Z., Sun, M. & Corke, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 370–376 (2005).

29. Gengatharan, A., Dykes, G. A. & Choo, W. S. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **64**, 645–649 (2015).
30. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
31. Gins, M. S., Gins, V. K. & Kononkov, P. F. Change in the biochemical composition of amaranth leaves during selection for increased amaranthine content. *Appl. Biochem. Microbiol.* **38**, 474–479 (2002).
32. Cai, Y.-Z., Sun, M. & Corke, H. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the *Amaranthaceae*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1971–1978 (2001).
33. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Biological Activities of Plant Pigments Betalains. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **8398**, 37–41 (2014).
34. Frank, T. *et al.* Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacol. Res.* **52**, 290–297 (2005).
35. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D. & Livrea, M. A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 941–945 (2004).
36. Lee, C.-H., Wettasinghe, M., Bolling, B. W., Ji, L.-L. & Parkin, K. L. Betalains, phase II enzyme-inducing components from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extracts. *Nutr. Cancer* **53**, 91–103 (2005).
37. Colaco e Clemente, A. & Desai, P. V. Evaluation of the hematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus tricolor* leaf extract in rat. *Trop. J. Pharm. Res.* **10**, 595–602 (2011).
38. Cheynier, V. Phenolic compounds : from plants to foods. *Phytochem. Rev.* **11**, 153–177 (2012).
39. Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2866–2887 (2003).
40. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jime, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
41. Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J. M. & Mattila, P. H. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chem.* **120**, 128–133 (2010).
42. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933–956 (1996).
43. Chua, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* **150**, 805–817 (2013).

44. Wach, A., Pyrzyńska, K. & Biesaga, M. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chem.* **100**, 699–704 (2007).
45. Miesan, K.-H. & Mohamed, S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3106–3112 (2001).
46. Paško, P., Sajewicz, M., Gorinstein, S. & Zachwieja, A. Z. Analysis of Selected Phenolic Acids and Flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* Seeds and Sprouts by HPLC. *Acta Chromatogr.* **20**, 661–672 (2008).
47. Kumar, S. & Pandey, A. K. Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **4**, 32–48 (2013).
48. Dangles, O. Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Curr. Org. Chem.* **16**, 692–714 (2012).
49. Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. & Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 637–647 (2011).
50. Fahy, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839–861 (2005).
51. Reddy, L. H. & Couvreur, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1412–1426 (2009).
52. Ege, S. *Química Orgánica: estructura y reactividad.* (Reverte, 1998).
53. Spanova, M. & Daum, G. Squalene - biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1299–1320 (2011).
54. Lagarda, M. J., García-Llatas, G. & Farré, R. Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1486–1496 (2006).
55. He, H. & Corke, H. Oil and Squalene in *Amaranthus* Grain and Leaf. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7913–7920 (2003).
56. Tudor, F. & Bean, G. Fatty acids and sterols of *Amaranthus tricolor* L. *Food Chem.* **15**, 233–237 (1984).
57. León-Camacho, M., García-González, D. L. & Aparicio, R. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 349–355 (2001).
58. Kim, S. K. & Karadeniz, F. Biological Importance and Applications of Squalene and Squalane. *Adv. Food Nutr. Res.* **65**, 223–233 (2012).
59. Schonewille, M., Brufau, G., Shiri-Sverdlov, R., Groen, A. K. & Plat, J. Serum TG-lowering properties of plant sterols and stanols are associated with decreased hepatic VLDL secretion. *J. Lipid Res.* **55**, 2554–2561 (2014).

60. Moghadasian, M. H. Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. *Life Sci.* **67**, 605–615 (2000).
61. Garcia-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y. & Valle-Guadarrama, S. Betalains, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Pitaya De Mayo (*Stenocereus Griseus* H.). *Rev. Fitotec. Mex.* **35**, 1–5 (2012).
62. Rodriguez-Amaya, D. B. *A Guide To Carotenoid Analysis in Food*. (OMNI Research, 1999).
63. Adebooye, O. C., Vijayalakshmi, R. & Singh, V. Peroxidase activity, chlorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. and *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment methods before cooking. *Int. J. Food Sci. Technol.* **43**, 173–178 (2008).
64. Altemimi, A., Watson, D. G., Kinsel, M. & Lightfoot, D. A. Simultaneous extraction, optimization, and analysis of flavonoids and polyphenols from peach and pumpkin extracts using a TLC-densitometric method. *Chem. Cent. J.* **9**, 1–15 (2015).
65. Soriano-Santos, J. *et al.* Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la ‘jiotilla’ (*Escontria chiotilla* Weber Britton & Rose). *Rev. Mex. Ing. Química* **6**, 19–25 (2007).
66. Schliemann, W., Cai, Y.-Z., Degenkolb, T., Schmidt, J. & Corke, H. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry* **58**, 159–165 (2001).
67. Islas-Gómez, E. Determinación del Perfil de Compuestos Bioactivos Fenólicos y Triterpénicos Pentacíclicos en Salvias Mexicanas. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013).
68. Ovalle-Magallanes, B., Rivero-Cruz, I. & Mata, R. Quality control tests for the crude drug of *Conyza filaginoides*. *Pharm. Biol.* **52**, 117–123 (2014).
69. Sandoval-Cortes, E. Desarrollo de un Proceso de Extracción para la Obtención de Fracciones Enriquecidas de Escualeno a partir de Amaranto. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2005). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
70. Cai, Y.-Z., Sun, M., Wu, H.-X., Huang, R. & Corke, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2063–2070 (1998).
71. Barickman, T. C. & Kopsell, D. A. Nitrogen form and ratio impact Swiss chard (*Beta vulgaris* subsp. *cicla*) shoot tissue carotenoid and chlorophyll concentrations. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **204**, 99–105 (2016).
72. Ninfali, P. & Angelino, D. Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris cicla* and *rubra*. *Fitoterapia* **89**, 188–199 (2013).
73. Stintzing, F. C. *et al.* Betacyanins and Phenolic Compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **59**, 1–8 (2004).

74. Vysochina, G. I., Kukushkina, T. A., Zheleznova, N. B. & Zheleznov, A. V. Biologically Active Substances of Amaranth (*Amaranthus* L.) from the Collection of the Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS (Novosibirsk). *Chem. Sustain. Dev.* **20**, 627–633 (2012).
75. Kalinova, J. & Dadakova, E. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**, 68–74 (2009).
76. Xu, S., Patterson, G. W. & Schmid, K. Sterols of *Amaranthaceae*. *Phytochemistry* **25**, 1883–1886 (1986).
77. Patterson, G. W. & Xu, S. Sterol Composition in Five Families of the Order *Caryophyllales*. *Phytochemistry* **29**, 3539–3541 (1990).
78. Patterson, G. W., Sihua, X. & Salt, T. A. Sterols of *Caryophyllales* with emphasis on *Amaranthaceae*. *Phytochemistry* **30**, 523–526 (1991).
79. Marcone, M. F., Kakuda, Y. & Yada, R. Y. Amaranth as a rich dietary source of sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods Hum. Nutr.* **58**, 207–211 (2004).
80. Cai, Y.-Z., Sun, M. & Corke, H. HPLC Characterization of Betalains from Plants in the *Amaranthaceae*. *J. Chromatogr. Sci.* **43**, 454–460 (2005).
81. Biswas, M., Dey, S. & Sen, R. Betalains from *Amaranthus tricolor* L. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **1**, 87–95 (2013).
82. Jerz, G. *et al.* Separation of amaranthine-type betacyanins by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* **1344**, 42–50 (2014).
83. Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W. & Corke, H. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4429–4435 (2001).
84. Stintzing, F. C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U. & Carle, R. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **65**, 415–422 (2004).
85. Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R. & Conrad, J. First C-13-NMR assignments of betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* **89**, 1008–1016 (2006).
86. Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B. & Mizrahi, Y. ¹H and ¹³C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1725–1728 (2006).
87. Sturzoiu, A., Stroescu, M., Stoica, A. & Dobre, T. Betanine extraction from *Beta vulgaris* - Experimental research and statistical modeling. *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.* **73**, 145–156 (2011).
88. Neagu, C. & Barbu, V. Principal component analysis of the factors involved in the extraction of beetroot betalains. *J. Agroaliment. Process. Technol.* **20**, 311–318 (2014).

89. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 519–546 (2003).
90. Corke, H., Cai, Y.-Z. & Wu, H. X. in *Encyclopedia of Food Grains* (eds. Wrigley, C. W., Faubion, J., Seetharaman, K. & Corke, H.) 287–296 (Elsevier Science & Technology Book, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-394437-5.00032-2
91. He, H.-P., Cai, Y.-Z., Sun, M. & Corke, H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 368–372 (2002).
92. He, H. Oil and squalene in *Amaranthus*. **1**, (University of Hong Kong, 2003).

12. Anexos

Anexo 1. Análisis estadístico

Tabla 1. ANOVA para betalainas totales por método de secado (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.682575	2	0.341288	104.39	0.0000
Intra grupos	0.0196158	6	0.0032693		
Total (Corr.)	0.702191	8			

Tabla 1.1 Pruebas de múltiples rangos para betalainas totales por método de secado

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Estufa (E)	3	0.9415	x
Sombra (S)	3	1.2761	x
Liofilizado (L)	3	1.6161	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
E – L	*	-0.674567	0.114236
E – S	*	-0.334533	0.114236
L – S	*	0.340033	0.114236

* indica una diferencia significativa.

Tabla 2. ANOVA para fenoles totales por método de secado (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	80.0909	2	40.0455	42.57	0.0003
Intra grupos	5.64474	6	0.94079		
Total (Corr.)	85.7357	8			

Tabla 2.1 Pruebas de múltiples rangos para fenoles totales por método de secado

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Estufa (E)	3	7.013	x
Sombra (S)	3	13.0097	x
Liofilizado (L)	3	13.6273	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
E – L	*	-6.61433	1.93785
E – S	*	-5.99667	1.93785
L – S		0.617667	1.93785

* indica una diferencia significativa.

Tabla 3. ANOVA para betalainas totales por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.81576	7	0.402251	189.49	0.0000
Intra grupos	0.0339656	16	0.00212285		
Total (Corr.)	2.84972	23			

Tabla 3.1 Pruebas de múltiples rangos para betalaínas totales por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

Colecta	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1289	3	0.385067	X
1272	3	0.4782	X
1235	3	0.5397	X
1262	3	0.661833	X
1392	3	1.11443	X
1433	3	1.13007	X
1213	3	1.16553	X
1370	3	1.30237	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1213 – 1235	*	0.625833	0.0797502
1213 – 1262	*	0.5037	0.0797502
1213 – 1272	*	0.687333	0.0797502
1213 – 1289	*	0.780467	0.0797502
1213 – 1370	*	-0.136833	0.0797502
1213 – 1392		0.0511	0.0797502
1213 – 1433		0.0354667	0.0797502
1235 – 1262	*	-0.122133	0.0797502
1235 – 1272		0.0615	0.0797502
1235 – 1289	*	0.154633	0.0797502
1235 – 1370	*	-0.762667	0.0797502
1235 – 1392	*	-0.574733	0.0797502
1235 – 1433	*	-0.590367	0.0797502
1262 – 1272	*	0.183633	0.0797502
1262 – 1289	*	0.276767	0.0797502
1262 – 1370	*	-0.640533	0.0797502
1262 – 1392	*	-0.4526	0.0797502
1262 – 1433	*	-0.468233	0.0797502
1272 – 1289	*	0.0931333	0.0797502
1272 – 1370	*	-0.824167	0.0797502
1272 – 1392	*	-0.636233	0.0797502
1272 – 1433	*	-0.651867	0.0797502
1289 – 1370	*	-0.9173	0.0797502
1289 – 1392	*	-0.729367	0.0797502
1289 – 1433	*	-0.745	0.0797502
1370 – 1392	*	0.187933	0.0797502
1370 – 1433	*	0.1723	0.0797502
1392 – 1433		-0.0156333	0.0797502

* indica una diferencia significativa.

Tabla 4. ANOVA para betacianinas por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.781971	7	0.11171	67.65	0.0000
Intra grupos	0.026419	16	0.00165119		
Total (Corr.)	0.80839	23			

Tabla 4.1 Pruebas de múltiples rangos para betacianinas por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Colecta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1289	3	0.1877	x
1235	3	0.239733	xx
1272	3	0.283033	x
1262	3	0.301333	x
1433	3	0.537233	x
1392	3	0.5678	xx
1213	3	0.627	xx
1370	3	0.6716	x

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1213 – 1235	*	0.387267	0.0703347
1213 – 1262	*	0.325667	0.0703347
1213 – 1272	*	0.343967	0.0703347
1213 – 1289	*	0.4393	0.0703347
1213 – 1370		-0.0446	0.0703347
1213 – 1392		0.0592	0.0703347
1213 – 1433	*	0.0897667	0.0703347
1235 – 1262		-0.0616	0.0703347
1235 – 1272		-0.0433	0.0703347
1235 – 1289		0.0520333	0.0703347
1235 – 1370	*	-0.431867	0.0703347
1235 – 1392	*	-0.328067	0.0703347
1235 – 1433	*	-0.2975	0.0703347
1262 – 1272		0.0183	0.0703347
1262 – 1289	*	0.113633	0.0703347
1262 – 1370	*	-0.370267	0.0703347
1262 – 1392	*	-0.266467	0.0703347
1262 – 1433	*	-0.2359	0.0703347
1272 – 1289	*	0.0953333	0.0703347
1272 – 1370	*	-0.388567	0.0703347
1272 – 1392	*	-0.284767	0.0703347
1272 – 1433	*	-0.2542	0.0703347
1289 – 1370	*	-0.4839	0.0703347
1289 – 1392	*	-0.3801	0.0703347
1289 – 1433	*	-0.349533	0.0703347
1370 – 1392	*	0.1038	0.0703347
1370 – 1433	*	0.134367	0.0703347
1392 – 1433		0.0305667	0.0703347

* indica una diferencia significativa.

Tabla 5. ANOVA para betaxantinas por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.667427	7	0.0953467	290.81	0.0000
Intra grupos	0.00524577	16	0.00032786		
Total (Corr.)	0.672672	23			

Tabla 5.1 Pruebas de múltiples rangos para betaxantinas por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Colecta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1272	3	0.195133	X
1289	3	0.1974	X
1235	3	0.299967	X
1262	3	0.360467	X
1213	3	0.538567	X
1392	3	0.546667	X
1433	3	0.592867	X
1370	3	0.630767	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1213 – 1235	*	0.2386	0.0313412
1213 – 1262	*	0.1781	0.0313412
1213 – 1272	*	0.343433	0.0313412
1213 – 1289	*	0.341167	0.0313412
1213 – 1370	*	-0.0922	0.0313412
1213 – 1392		-0.0081	0.0313412
1213 – 1433	*	-0.0543	0.0313412
1235 – 1262	*	-0.0605	0.0313412
1235 – 1272	*	0.104833	0.0313412
1235 – 1289	*	0.102567	0.0313412
1235 – 1370	*	-0.3308	0.0313412
1235 – 1392	*	-0.2467	0.0313412
1235 – 1433	*	-0.2929	0.0313412
1262 – 1272	*	0.165333	0.0313412
1262 – 1289	*	0.163067	0.0313412
1262 – 1370	*	-0.2703	0.0313412
1262 – 1392	*	-0.1862	0.0313412
1262 – 1433	*	-0.2324	0.0313412
1272 – 1289		-0.00226667	0.0313412
1272 – 1370	*	-0.435633	0.0313412
1272 – 1392	*	-0.351533	0.0313412
1272 – 1433	*	-0.397733	0.0313412
1289 – 1370	*	-0.433367	0.0313412
1289 – 1392	*	-0.349267	0.0313412
1289 – 1433	*	-0.395467	0.0313412
1370 – 1392	*	0.0841	0.0313412
1370 – 1433	*	0.0379	0.0313412
1392 – 1433	*	-0.0462	0.0313412

* indica una diferencia significativa.

Tabla 6. ANOVA para clorofilas totales por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7.04925	7	1.00704	20.38	0.0000
Intra grupos	0.790629	16	0.0494143		
Total (Corr.)	7.83988	23			

Tabla 7. ANOVA para carotenos totales por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	351964.	7	50280.5	33.88	0.0000
Intra grupos	23742.0	16	1483.88		
Total (Corr.)	375706.	23			

Tabla 8. ANOVA para fenoles totales por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	72.1217	7	10.3031	7.63	0.0004
Intra grupos	21.6121	16	1.35076		
Total (Corr.)	93.7338	23			

Tabla 8.1 Pruebas de múltiples rangos para fenoles totales por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

Colecta	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1235	3	8.05867	X
1289	3	8.682	X
1262	3	10.965	X
1272	3	11.147	X
1433	3	12.3537	X
1213	3	12.392	X
1392	3	12.6453	X
1370	3	12.9197	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1213 – 1235	*	4.33333	2.01169
1213 – 1262		1.427	2.01169
1213 – 1272		1.245	2.01169
1213 – 1289	*	3.71	2.01169
1213 – 1370		-0.527667	2.01169
1213 – 1392		-0.253333	2.01169
1213 – 1433		0.0383333	2.01169
1235 – 1262	*	-2.90633	2.01169
1235 – 1272	*	-3.08833	2.01169
1235 – 1289		-0.623333	2.01169
1235 – 1370	*	-4.861	2.01169
1235 – 1392	*	-4.58667	2.01169
1235 – 1433	*	-4.295	2.01169
1262 – 1272		-0.182	2.01169
1262 – 1289	*	2.283	2.01169
1262 – 1370		-1.95467	2.01169
1262 – 1392		-1.68033	2.01169
1262 – 1433		-1.38867	2.01169
1272 – 1289	*	2.465	2.01169
1272 – 1370		-1.77267	2.01169
1272 – 1392		-1.49833	2.01169
1272 – 1433		-1.20667	2.01169
1289 – 1370	*	-4.23767	2.01169
1289 – 1392	*	-3.96333	2.01169
1289 – 1433	*	-3.67167	2.01169
1370 – 1392		0.274333	2.01169
1370 – 1433		0.566	2.01169
1392 – 1433		0.291667	2.01169

* indica una diferencia significativa.

Tabla 9. ANOVA para flavonoides totales por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.04477	7	0.720681	0.60	0.7458
Intra grupos	19.1518	16	1.19699		
Total (Corr.)	24.1965	23			

Tabla 10. ANOVA para amarantina por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	137901.	7	19700.2	717.80	0.0000
Intra grupos	439.122	16	27.4451		
Total (Corr.)	138341.	23			

Tabla 10.1. Pruebas de Múltiple Rangos para amarantina por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

Colecta	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1235	3	4.41182	X
1262	3	4.51197	X
1289	3	4.55291	X
1370	3	12.2413	XX
1272	3	20.4308	X
1433	3	37.3731	X
1213	3	132.029	X
1392	3	225.431	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1213 - 1235	*	127.617	9.06785
1213 - 1262	*	127.517	9.06785
1213 - 1272	*	111.598	9.06785
1213 - 1289	*	127.476	9.06785
1213 - 1370	*	119.788	9.06785
1213 - 1392	*	-93.4019	9.06785
1213 - 1433	*	94.6559	9.06785
1235 - 1262		-0.100151	9.06785
1235 - 1272	*	-16.019	9.06785
1235 - 1289		-0.141087	9.06785
1235 - 1370		-7.82951	9.06785
1235 - 1392	*	-221.019	9.06785
1235 - 1433	*	-32.9613	9.06785
1262 - 1272	*	-15.9188	9.06785
1262 - 1289		-0.0409363	9.06785
1262 - 1370		-7.72936	9.06785
1262 - 1392	*	-220.919	9.06785
1262 - 1433	*	-32.8611	9.06785
1272 - 1289	*	15.8779	9.06785
1272 - 1370		8.18946	9.06785
1272 - 1392	*	-205.0	9.06785
1272 - 1433	*	-16.9423	9.06785
1289 - 1370		-7.68842	9.06785
1289 - 1392	*	-220.878	9.06785
1289 - 1433	*	-32.8202	9.06785
1370 - 1392	*	-213.189	9.06785
1370 - 1433	*	-25.1318	9.06785
1392 - 1433	*	188.058	9.06785

* indica una diferencia significativa.

Tabla 11. ANOVA para rutina por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.375964	7	0.0537091	34.63	0.0000
Intra grupos	0.0248147	16	0.00155092		
Total (Corr.)	0.400778	23			

Tabla 11.1 Pruebas de múltiples rangos para rutina por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

colecta	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1370	3	0.35932	X
1262	3	0.413096	X
1433	3	0.555864	X
1213	3	0.596881	X
1392	3	0.618927	XX
1235	3	0.673362	XX
1289	3	0.714326	X
1272	3	0.720141	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1213 - 1235	*	-0.0764814	0.0681657
1213 - 1262	*	0.183785	0.0681657
1213 - 1272	*	-0.12326	0.0681657
1213 - 1289	*	-0.117446	0.0681657
1213 - 1370	*	0.237561	0.0681657
1213 - 1392		-0.0220462	0.0681657
1213 - 1433		0.0410168	0.0681657
1235 - 1262	*	0.260266	0.0681657
1235 - 1272		-0.0467786	0.0681657
1235 - 1289		-0.0409642	0.0681657
1235 - 1370	*	0.314042	0.0681657
1235 - 1392		0.0544352	0.0681657
1235 - 1433	*	0.117498	0.0681657
1262 - 1272	*	-0.307044	0.0681657
1262 - 1289	*	-0.30123	0.0681657
1262 - 1370		0.0537766	0.0681657
1262 - 1392	*	-0.205831	0.0681657
1262 - 1433	*	-0.142768	0.0681657
1272 - 1289		0.00581434	0.0681657
1272 - 1370	*	0.360821	0.0681657
1272 - 1392	*	0.101214	0.0681657
1272 - 1433	*	0.164277	0.0681657
1289 - 1370	*	0.355007	0.0681657
1289 - 1392	*	0.0953994	0.0681657
1289 - 1433	*	0.158462	0.0681657
1370 - 1392	*	-0.259607	0.0681657
1370 - 1433	*	-0.196544	0.0681657
1392 - 1433		0.063063	0.0681657

* indica una diferencia significativa.

Tabla 12. ANOVA para escualeno por diferente colecta de quelite (95.0% de confianza)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.03415	7	0.862022	44.72	0.0000
Intra grupos	0.15422	16	0.0192775		
Total (Corr.)	6.18837	23			

Tabla 12.1 Pruebas de múltiples rangos para escualeno por diferente colecta de quelite

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Colecta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1370	3	1.61967	×
1235	3	1.73227	×
1272	3	1.76594	×
1392	3	1.90153	×
1213	3	2.90711	×
1289	3	2.97586	×
1433	3	2.99635	×
1262	3	3.01454	×

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1213 - 1235	*	1.17484	0.320175
1213 - 1262		-0.107423	0.320175
1213 - 1272	*	1.14118	0.320175
1213 - 1289		-0.0687444	0.320175
1213 - 1370	*	1.28744	0.320175
1213 - 1392	*	1.00559	0.320175
1213 - 1433		-0.0892345	0.320175
1235 - 1262	*	-1.28226	0.320175
1235 - 1272		-0.0336635	0.320175
1235 - 1289	*	-1.24359	0.320175
1235 - 1370		0.112602	0.320175
1235 - 1392		-0.169256	0.320175
1235 - 1433	*	-1.26408	0.320175
1262 - 1272	*	1.2486	0.320175
1262 - 1289		0.0386782	0.320175
1262 - 1370	*	1.39487	0.320175
1262 - 1392	*	1.11301	0.320175
1262 - 1433		0.0181881	0.320175
1272 - 1289	*	-1.20992	0.320175
1272 - 1370		0.146266	0.320175
1272 - 1392		-0.135593	0.320175
1272 - 1433	*	-1.23041	0.320175
1289 - 1370	*	1.35619	0.320175
1289 - 1392	*	1.07433	0.320175
1289 - 1433		-0.0204901	0.320175
1370 - 1392		-0.281859	0.320175
1370 - 1433	*	-1.37668	0.320175
1392 - 1433	*	-1.09482	0.320175

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2. Curvas de calibración para mediciones por HPLC y CG

Tabla 1. Fenoles Totales

Pendiente	2.1240
Ordenada al Origen	0.0834
Coefficiente de correlación lineal	0.9919

Tabla 2. Flavonoides Totales

Pendiente	2.4556
Ordenada al Origen	0.0116
Coefficiente de correlación lineal	0.9987

Tabla 3. Amarantina

Pendiente	142170019
Ordenada al Origen	-40803.89
Coefficiente de correlación lineal	0.9970

Tabla 4. Ácidos fenólicos

Ácido	Gálico	Dihidroxibenzóico	Caféico	Ferúlico
Pendiente	1382200	1075092.17	75583667.86	147622602.70
Ordenada al origen	6036	15210.61	537204.52	4924.41
Coefficiente de correlación lineal	0.9939	0.99427	0.9964	0.9972

Tabla 5. Rutina

Pendiente	8724.54
Ordenada al origen	-46.058
Coefficiente de correlación lineal	0.9969

Tabla 6. Escualeno

Pendiente	5792.54
Ordenada al origen	22.110
Coefficiente de correlación lineal	0.9963

