



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y
TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en
hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.).**

Tesis que presenta

Ricardo J. Rodríguez Enríquez.

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Codirector de Tesis

Senior Scientist Ph.D. Inge S. Fomsgaard

Créditos Institucionales

Ésta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Así como también en el Laboratorio de Manejo Integral de Plagas de la Facultad de Ciencias de la Agricultura de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, Bajo la Codirección de la Senior Scientist , Ph.D. Inge S. Fomsgaard

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica 204181 y una beca mixta del 15 de agosto al 15 de diciembre de 2007 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,



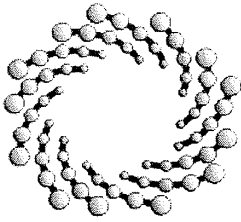
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas” presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ricardo José Rodríguez Enríquez** y aprobada el **14 de Julio del 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Presidente

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Secretario

Dra. Ma. Fabiola León Galván
Vocal



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 050 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2008, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Secretaria	IPICYT
Dra. Ma. Fabiola León Galván	Sinodal externo	Proyecto de Investigación de la DBM-IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Ricardo José Rodríguez Enríquez

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización Cualitativa y Cuantitativa de Ácidos Fenólicos y Flavonoides en Hojas de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.)*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa
Dra. Inge S. Fomsgaard (Aarhus Universitet, Dinamarca)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de julio de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Borilla Marín
Secretario Académico



INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
INDICE	i
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción	1
1.1 Generalidades del amaranto	1
1.2 Características de la hoja de amaranto	3
1.3 Estructura y Función de la Hoja	3
1.4 Alimentos funcionales	7
1.5 Nutracéuticos	7
1.6 Metabolómica	9
1.7 Metabolómica vegetal	11
1.8 Clasificación de los compuestos fenólicos	13
1.8.1 La ruta del ácido Shikímico	14
1.8.2 Ácidos Fenólicos	17
1.8.3 Flavonoides	18
II. Justificación	22
III. Objetivos	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos particulares	23
IV. Material y métodos	24
4.1 Muestreo de plantas para análisis de ácidos fenólicos y flavonoides	24

4.2	Iniciativa de estándares metabolómicos	24
4.3	Reactivos y químicos	26
4.4	Soluciones estándar	27
4.5	Extracción de ácidos fenólicos y flavonoides	27
4.5.1	Extracción acelerada con solventes	27
4.5.2	Extracción por agitación	31
4.6	Análisis químico de ácidos fenólicos y de flavonoides	31
5.	Resultados y discusión	33
5.1	Contenido de ácidos fenólicos en hojas de amaranto	35
5.1.1	Ácido p-cumárico y ferúlico	35
5.1.2	Ácido cafeico	37
5.1.4	Ácido 4-hidroxibenzoico	40
5.1.5	Ácido salicílico	44
5.2	Contenido de flavonoides en hojas de amaranto	47
5.2.1	Comparación del método de extracción	47
5.2.2	Rutina	51
5.2.3	Iso-quercetina	54
5.2.4	Nicotiflorin	58
VI.	CONCLUSIONES	62
VII.	REFERENCIAS	64
7.1	Referencias web	70
VIII.	PERSPECTIVAS	71

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Estructuras de los fenoles analizados en hojas de amaranto	29
Cuadro 2. Estructuras de los flavonoides detectados en hojas de amaranto	30
Cuadro 3. Contenido fenólico en hojas rojas y verdes de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> cultivados en distintas condiciones	41
Cuadro 4. Contenido de flavonoides en hojas rojas y verdes de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> cultivados en distintas condiciones	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrografía de luz de un corte transversal de hoja de <i>Amaranthus lividus</i> .	4
Figura 2. Subgrupo de la ruta C ₄ : tipo enzima málica-NAD (NAD-ME)	5
Figura 3. Estructuras representativas de algunos compuestos fenólicos. A) Fenol; B) Ácido salicílico; C) Un Flavonoide (rutina); D) Taninos condensados.	14
Figura 4. Ruta del Acido Shikimico	15
Figura 5. Ruta general de los Fenilpropanoides	19
Figura 6. Estructura genérica de los flavonoides	19
Figura 7. Biosíntesis de los Flavonoides	21
Figura 8. <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . A) variedad Nutrisol y B) variedad Criolla.	25
Figura 9. ASE. Curva patrón de iso-quercetina utilizada para la determinación cuantitativa.	33
Figura 10. ASE. Curva patrón de nitiflorinco utilizada para la determinación cuantitativa.	34
Figura 11. ASE. Curva patrón de rutina utilizada para la determinación cuantitativa.	34
Figura 12. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectó ácido p-cumárico.	36
Figura 13. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas crecidas en maceta pequeña en invernadero donde se detectó ácido ferúlico.	37
Figura 14. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto donde se detectó ácido cafeico.	38
Figura 15. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto mostrando daño por insecto donde se detectó ácido cafeico.	39

Figura 16. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas crecidas en campo abierto donde se detectó ácido cafeico.	39
Figura 17. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas crecidas en campo abierto mostrando daño por insecto donde se detectó ácido cafeico.	39
Figura 18. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectó ácido cafeico.	40
Figura 19. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectó ácido 4-hidroxibenzoico.	42
Figura 20. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas crecidas en campo donde se detectó ácido 4-hidroxibenzoico.	42
Figura 21. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta pequeña en invernadero donde se detectará ácido 4-hidroxibenzoico.	43
Figura 22. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectó ácido 4-hidroxibenzoico.	43
Figura 23. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas campo mostrando daño por insecto donde se detectó ácido 4-hidroxibenzoico.	43
Figura 24. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas cultivadas campo mostrando daño por insecto donde se detectó ácido salicílico.	45
Figura 25. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta pequeña en invernadero donde se detectó ácido salicílico.	45

Figura 26. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectó ácido salicílico.	46
Figura 27. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en campo con daño por insecto donde se detectó ácido salicílico.	46
Figura 28. Cromatogramas de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo realizado a la muestra proveniente hojas verdes de plantas crecidas en maceta grande dentro de invernadero mostrando ambos métodos de extracción. A) ASE; B) Agitación.	48
Figura 29. Producción de flavonoids en hojas de amaranto bajo diferentes condiciones de cultivo. A) extraídos con el método de extracción con solventes acelerada (ASE). B) extraídos por el método de agitación.	49
Figura 30. Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó la rutina, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas: A) verdes e B) rojas, cultivadas en distintas condiciones.	52
Figura 31. Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó la iso-quercetina, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas: A) verdes e B) rojas, cultivadas en distintas condiciones.	55
Figura 32. Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó el nicotiflorin, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas: A) verdes e B) rojas, cultivadas en distintas condiciones.	59

Resumen

Las hojas de amaranto (*Amaranthus spp*) son consideradas como plantas medicinales y son utilizadas para preparar alimentos. El objetivo de éste trabajo fue obtener el perfil cualitativo y cuantitativo de ácidos fenólicos y flavonoides en hojas de dos variedades de *A. hypochondriacus* con diferentes colores de hojas (rojas y verdes) crecidos en diferentes condiciones de cultivo (maceta chica y grande dentro de invernadero; cultivadas en campo, cultivadas en campo pero que presentaban daño por insecto). Los ácidos fenólicos son compuestos involucrados en la respuesta al estrés biótico y abiótico por las plantas mientras que los flavonoides son compuestos con mayor frecuencia relacionados con las propiedades nutraceuticas. La cuantificación de tres flavonoides y cinco ácidos fenólicos en hojas de amaranto se determinó empleando la metodología de extracción con solventes acelerada (ASE) y la cromatografía de líquidos acoplada a espectrómetro de masas (LC/MS/MS). En las hojas de amaranto, el principal flavonoide fue la rutina, en concentraciones de 3441 hasta 9236 $\mu\text{g/g}$. La concentración de nicotiflorin fue de 523 a 1,297 $\mu\text{g/g}$, y la de la iso-quercitrina fue de 371 a 930 $\mu\text{g/g}$. Los ácidos fenólicos fueron los compuestos detectados en menor proporción en las hojas de amaranto. El ácido ferúlico se detectó únicamente en hojas rojas (0.5 $\mu\text{g/g}$) crecidas en maceta pequeña en invernadero, mientras que el ácido cumárico solo se detectó en hojas verdes (0.7 $\mu\text{g/g}$) cultivadas en maceta grande en invernadero. Los resultados indican que la producción de ciertos productos naturales en hojas de amaranto puede ser influenciada por las condiciones de cultivo.

Palabras clave: *Amaranthus hypochondriacus*, color de hoja, estrés abiótico, estrés biótico, nutraceuticos.

Abstract

Leaves from amaranth (*Amaranthus* spp.) are used as medicines and in the preparation of food. The aim of this work was to obtain the qualitative and quantitative profile of flavonoid and phenolic acid compounds in leaves of two varieties of *A. hypochondriacus* with different leaf colors (red and green) that were grown in different conditions (small and big pots inside greenhouse, grown in fields, grown in fields with insect damage). Phenolic acids are compounds produced in response to biotic and abiotic stresses in plants, while flavonoids are related to the nutraceutical properties of amaranth leaves. The three flavonoids and five phenolic acids in amaranth leaves were determined using accelerated solvent extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. In amaranth leaves the main flavonoid was rutin, with concentrations from 3,441-9,236 $\mu\text{g/g}$; the concentration of nicotiflorin ranged from 1,297–523 $\mu\text{g/g}$, and for iso-quercitrin 930–371 $\mu\text{g/g}$. Phenolic acids were minor compounds in amaranth leaves: ferulic acid was only present in red leaves grown in small pots in greenhouse (0.5 $\mu\text{g/g}$) and coumaric acid was only detected in green leaves (0.7 $\mu\text{g/g}$). Our findings indicate that the production of certain natural products in amaranth leaves could be influenced by growth conditions.

Keywords: Abiotic stress, *Amaranthus hypochondriacus*, biotic stress, leaf color, nutraceuticals

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del amaranto

El amaranto es cultivado desde hace miles de años, su presencia en México, en Tehuacán, Puebla se remonta a 4,000 a.C., convirtiéndolo en uno de los cultivos más antiguos. Este grano fue un cultivo importante para las civilizaciones Azteca, Maya e Inca. Se empleaba para preparar un “pan” especial utilizado en ceremonias religiosas, y principalmente debido a esto, el cultivo fue prohibido por los españoles a su llegada a América.

El genero *Amaranthus*, pertenece a la familia Amaranthaceae, y es de origen tropical ampliamente distribuido alrededor del mundo, en climas templados. Aproximadamente 50 especies son nativas de América y otras 15 pueden encontrarse en Europa, Asia, Africa y Australia. La mayoría de las especies de amaranto son colonizadores anuales de habitats abiertos que producen muchas pequeñas semillas. La gran producción de semillas está asociada con su latencia prolongada y con una rápida germinación (Paredes-López y Valverde, 1994). El Amaranto tiene un ciclo de vida corto, de 150 a 180 días, dependiendo de la especie y variedad (ej. la variedad Nutrisol presenta un ciclo de vida entre 160-200 días). El rendimiento por hectárea varía entre 1 y 2 toneladas, para cultivos sin irrigación. Los granjeros experimentados pueden obtener de 1 a 4 toneladas en condiciones de irrigación (<http://www.amaranto.org.mx>).

El grano de amaranto contiene de 6 a 9 % de lípidos, un porcentaje mayor, al descrito en la mayoría de los cereales. El aceite de amaranto contiene aproximadamente 77% de ácidos grasos no saturados y es rico en ácido linoléico, necesario para la nutrición humana (Martirosyan et al., 2007). La fracción lipídica es única debido a su alto contenido de escualeno. Se sabe que el escualeno es un metabolito intermediario en la síntesis de colesterol. En ratones cuya dieta ha sido suplementada con esqualeno se han reportado incrementos marcados en funciones inmunes no específicas y celulares en una manera dosis-dependiente (Kelly, 1999). Por otro lado, las proteínas de la semilla de amaranto se caracterizan por tener un balance de aminoácidos esenciales muy similar al balance óptimo requerido en la dieta humana según la FAO/WHO. El contenido de lisina (3.2-6.4%) es más alto que el encontrado en los cereales más comunes, y la concentración de aminoácidos azufrados (2.6-5.5%) es mayor que la de las legumbres más importantes (Segura-Nieto et al., 1994). De acuerdo con su solubilidad, las proteínas de amaranto se pueden clasificar en cuatro grupos principales: albúminas, solubles en agua; globulinas (7S y 11S), solubles en concentraciones salinas altas; prolaminas, solubles en alcohol acuoso; y glutelinas, solubles en soluciones ácidas o alcalinas. La fracción proteínica más abundante son las albúminas (48.9-65%), seguidas de las glutelinas (22.4-42.3%). Otras partes comestibles de la planta de amaranto han recibido menor atención que el grano del Amaranto (Martirosyan et al., 2007).

1.2 Características de la hoja de amaranto

En América, desde tiempos prehispánicos, los Aztecas utilizaban las hojas del amaranto para preparar infusiones contra la diarrea y para tratar el reumatismo (www.amaranto.com.mx). *Amaranth spinus* L., planta de la familia de las Amaranthaceae, se cultiva en la India y es empleada como planta medicinal para tratar la malaria, desórdenes hepáticos, antidiurético y anti-inflamatorio; sus constituyentes más importantes son sitosterol, estigmasterol y rutina también ha sido reportada (Olajide et al., 2004; Suryavanshi et al., 2007). Se ha estimado que sus hojas contienen mayores niveles de minerales (calcio, hierro, fósforo) y carotenoides que la mayoría de los vegetales. Se ha determinado que *A. paniculatus* y *A. cruentus* son buena fuente de flavonoides, especialmente de rutina, sintetizándose en su mayoría en el estadio de florecimiento (Martirosyan et al., 2007).

1.3 Estructura y Función de la Hoja

Las hojas de amaranto son alternadas, enteras y petioladas (Paredes-López y Valverde, 1994). Poseen la anatomía de tipo-Krantz, característico de plantas C_4 (Dengler y Nelson, 1999). En las hojas que presentan la anatomía de tipo Krantz cada vena menor está rodeada por células clorenquimáticas que conforman la vaina del haz, las cuales a su vez están rodeadas por una capa de células mesófilas dispuestas radialmente (Figura 1).

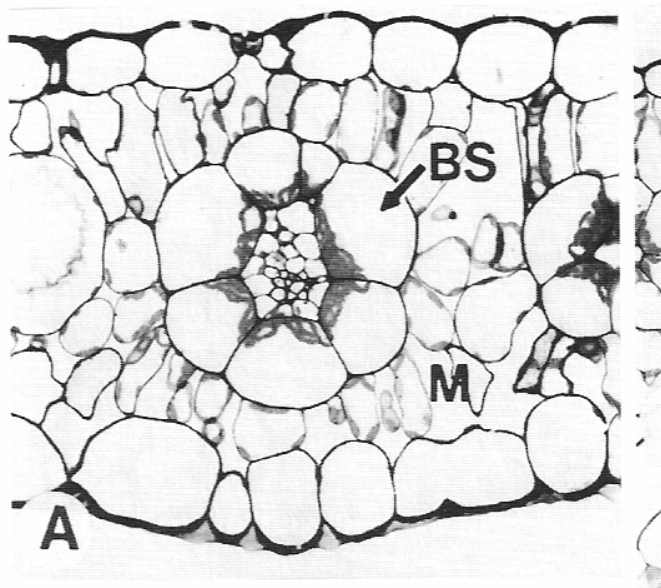


Figura. 1 Micrografía de luz de un corte transversal de hoja de *Amaranthus lividus*, una dicotiledonea C₄ (Dengler y Nelson, 1999).

Las células mesófilas difieren de las células de la vaina del haz en sus actividades fotosintéticas (Paredes-López y Valverde, 1994). Es decir, existe un paso inicial de asimilación de carbono primario (ACP) en las células del mesófilo, en tanto que en las células de la vaina se lleva a cabo un segundo paso de reducción de carbono fotosintético (RCF). En hojas de plantas C₄, el CO₂ atmosférico entra a través de los estomas y es accesible primero para las células del mesófilo donde se fija por la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa para formar oxalacetato y después malato y aspartato. Estos ácidos dicarboxílicos se transportan a las células de la vaina del haz donde se descarboxilan. El CO₂ liberado se vuelve a fijar por la ribulosa-1,5, bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y es dirigido hacia las enzimas del ciclo RCF para formar sacarosa y almidón (Dengler y Nelson, 1999). En consecuencia, a altas temperaturas (> 25°C) y altas intensidades de luz, la fijación fotosintética de CO₂ por las plantas C₄ es aproximadamente dos veces mayor que en plantas

C₃, donde Rubisco se emplea directamente para la fijación del CO₂. Las plantas C₄ se clasifican en tres subgrupos (enzima málica NADP dependiente, enzima málica NAD dependiente y enzima PEP carboxiquinasa) de acuerdo a las diferencias entre las enzimas del paso de descarboxilación dentro de las células de la vaina del haz. Cada tipo C₄ muestra diferenciación morfológica en el arreglo de sus cloroplastos dentro de las células de la vaina del haz, diferencias bioquímicas entre las células del mesófilo y las células de la vaina del haz y diferencias en el método de transporte de metabolitos (Kanai y Edwards, 1999). Los amarantos pertenecen al tipo enzima málica-NAD dependiente (NAD-ME) de las plantas C₄ (Paredes-López y Valverde, 1994) como se muestra en la figura 2.

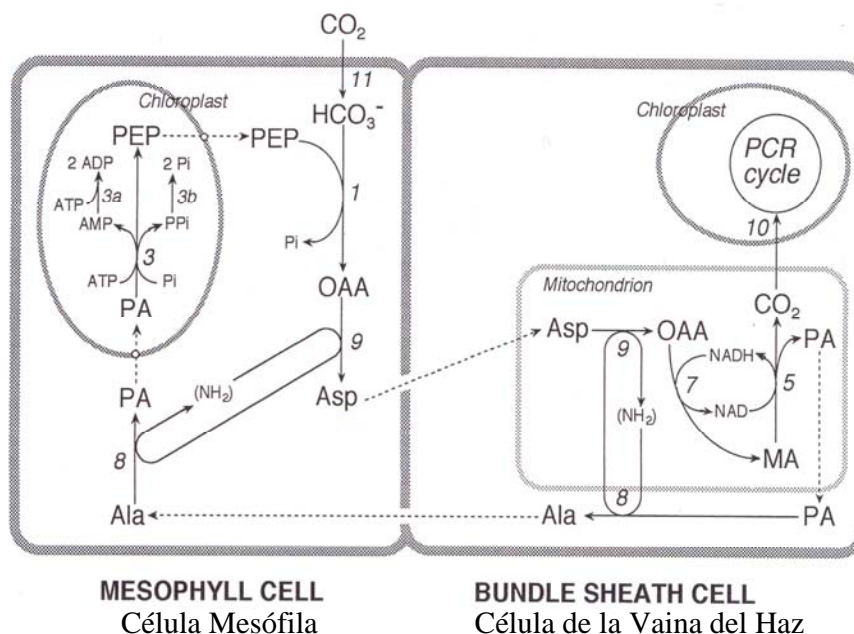


Figura. 2 Metabolismo del subgrupo de la ruta C₄: tipo enzima málica-NAD (NAD-ME). Abreviaciones de los compuestos: Ala, alanina; Asp, aspartato; OAA, oxalacetato; PA, piruvato; PCR, photosynthesis carbon reduction; PEP, fosfoenolpiruvato; Pi, ortofosfato; PPi, pirofosfato. Abreviaciones de las enzimas: 1, PEP carboxilasa; 2, NADP-malato deshidrogenasa; 3, piruvato fosfato dicinasa; 3a, adenilato cinasa; 3b, pirofosfatasa; 5, enzima NAD-málica; 7, NAD-malato deshidrogenasa; 8, alanina aminotransferasa; 9, aspartato aminotransferasa; 10, Rubisco carboxilasa (Kanai y Edwards, 1999).

El principal producto de la fijación de CO₂ es el aspartato, formado por medio de la aspartato amino transferasa en el citoplasma de las células del mesófilo. El aspartato es transportado a las mitocondrias de las células de la vaina del haz donde sufre una desaminación por medio de la aspartato amino transferasa. El producto de esta reacción es el oxalacetato, que es reducido por la NAD-malato deshidrogenasa, produciendo malato, que a su vez es descarboxilado por la NAD-ME para mandar el CO₂ generado a los cloroplastos de las células de la vaina del haz (Dengler y Nelson, 1999). Así como en otros formadores de aspartato, las células de la vaina del haz en amaranto carecen de una lámina de suberina y sus cloroplastos y mitocondrias se encuentran concentrados en el lado de la célula adyacente al haz vascular. La mayoría de las células mesófilas se encuentran en contacto directo con las células de la vaina del haz. Los cloroplastos de las células del parénquima esponjoso presentan un grana bien desarrollado, mientras que los del parénquima en empalizada están pobremente desarrollados. El gran número y tamaño de las mitocondrias de las células de la vaina del haz son característicos de las especies de enzima tipo NAD-málica y juegan un papel central en la fijación del CO₂ (Paredes-López y Valverde, 1994).

La expresión de genes que codifican para enzimas fotosintéticas C₄ durante el desarrollo temprano de la hoja se ha estudiado en *A. hypochondriacus*. Se ha observado que los genes que codifican para las proteínas específicas de las células de la vaina del haz y mesófilas muestran patrones distintos de expresión durante el desarrollo de la hoja. En hojas muy jóvenes (< 10 mm) la subunidad grande de Rubisco codificada en el cloroplasto y la subunidad pequeña codificada

en el núcleo se encuentran presentes en ambos tipos celulares. Las subunidades de Rubisco se vuelven más específicas para las células de la vaina del haz conforme la hoja se expande. Las subunidades grande y pequeña de Rubisco no son sintetizadas en ausencia de luz en los cotiledones de *A. hypochondriacus* (Paredes-López y Valverde, 1994)

1.4 Alimentos Funcionales

Una nutrición balanceada asegura la ingesta adecuada de nutrientes necesarios para realizar de forma eficiente todos los procesos metabólicos y contribuir también a mantener la salud humana. Esto es un nuevo reto para la industria alimenticia debido a que los consumidores demandan además de sabor, alimentos saludables. Los intentos de la industria alimenticia por omitir compuestos dañinos para la salud, e incorporar constituyentes con efectos benéficos, han definido el término de “Alimento Funcional”, que comprende alimentos frescos o procesados, cuyas propiedades promueven la salud o ayudan a prevenir enfermedades. Los ingredientes activos de estos productos se conocen como “nutracéuticos” (Schwager et al., 2008).

1.5 Nutracéuticos

Nutracéutico es un término acuñado en 1989 por Stephen DeFelice (DeFelice, 1992), y se define como un alimento o partes de un alimento que proveen de

beneficios médicos o de la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Los nutraceuticos se pueden encontrar como nutrientes aislados, suplementos de la dieta, alimentos diseñados por ingeniería genética, productos herbales y productos procesados, como cereales, sopas y bebidas (Lin y Weng, 2006). En países industrializados, especialmente en Europa, el mercado de nutraceuticos ha exhibido altas tasas de crecimiento (Verbeke, 2005), reflejando en parte una mayor tendencia hacia el uso de suplementos dietéticos (Kwak y Jukes, 2001) influenciado por una evidencia científica creciente de la unión entre ciertos ingredientes funcionales (ej. ácidos grasos, Omega-3, prebióticos, etc.) y un bienestar general acrecentado aunado a la reducción del riesgo de enfermedades específicas (Diplock et al., 1999). El sector procesador de alimentos ha respondido con altas tasas de desarrollo de nuevos productos que presenta a los consumidores un mayor número de opciones con respecto al vehículo a través del cual los ingredientes funcionales son suministrados, incluyendo píldoras y una amplia variedad de productos alimenticios (Herath et al., 2007; Verbeke, 2005, 2006; Henson et al., 2008).

El amaranto es un alimento funcional rico en nutraceuticos. El interés en su cultivo está basado en las propiedades de las semillas tales como alta calidad en el contenido proteínico, alto contenido de grasas en relación con otros granos (rico en ácidos grasos no saturados), la presencia de tocoferoles, tocotrienoles y escualeno (Klimczack et al., 2002). Además, contiene péptidos con potencial

anticarcinogénico y antihipertensivo (Silva-Sánchez et al., 2008). Las hojas tienen más hierro que las espinacas. Contienen mucha fibra, vitamina A y C así como calcio y magnesio. Estas características lo convierten en “el mejor alimento vegetal para el consumo humano”, nombramiento otorgado por la Academia Nacional de Ciencias (NAS) de Estados Unidos en 1979 (<http://www.amaranto.org.mx>).

1.6 Metabolómica

La palabra metabolismo proviene del griego *metabole* que significa cambio y se define como el conjunto de reacciones y procesos físico-químicos que ocurren en la célula que generan o usan energía (<http://www.nlm.nih.gov>). Las etapas biosintéticas del metabolismo (fotosíntesis, síntesis de proteínas y lípidos etc) se consideran como reacciones anabólicas y las de degradación (rompimiento de moléculas complejas en componentes más simples) como reacciones catabólicas. Sin embargo, el metabolismo también puede ser subdividido de otra forma, en metabolismo primario y secundario (Hopkins, 1999). Los metabolitos primarios son compuestos que tienen papeles esenciales asociados a la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo. Esto incluye carbohidratos, lípidos, aminoácidos, péptidos, proteínas y vitaminas. Otros fitoquímicos son referidos como metabolitos secundarios como los flavonoides, terpenos, alcaloides y acetilenos. Son estructuralmente diversos y muchos se encuentran distribuidos dentro de un limitado número de especies dentro del reino vegetal y por lo tanto, pueden emplearse como diagnóstico en estudios quimo-taxonómicos. Su función en las plantas es diversa, brindan protección contra herbívoros e infecciones

microbianas, además de atraer polinizadores y animales necesarios para dispersar las semillas, como agentes alelopáticos, protectores contra luz UV y moléculas señalizadoras en la formación de los nodulos fijadores de nitrógeno en las raíces de legumbres. Los metabolitos secundarios son también de interés debido a su uso como tintes, fibras, pegamentos, aceites, ceras, saborizantes, drogas y perfumes. Actualmente se consideran fuentes potenciales de nuevos fármacos naturales, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Crozier et al., 2006).

Los metabolitos secundarios han sido desarrollados a través de la evolución debido principalmente a la condición sésil de las plantas, en las cuales las perturbaciones en el ambiente, temporales y estacionales han sido compensadas por medio de respuestas que son facilitadas por medio de cambios metabólicos. Como las plantas deben lidiar continuamente con factores de estrés abiótico (luz, UV, agua) y biótico (herbivorismo, parasitismo y ataque de patógenos), para esto, han desarrollado un arsenal metabólico complejo de los cuales, algunos compuestos son comunes pero muchos de ellos están especializados a nivel de género o incluso tal vez de especies (Hall, 2006). La calidad de los cultivos vegetales es una función directa de su contenido metabólico (Memelik, 2005) y esto también determina su valor comercial en relación a los aspectos del sabor, fragancia, vida de anaquel, atributos físicos, etc. Cada uno de estos metabolitos puede definirse en términos del perfil metabólico del material concerniente a una etapa en particular (Hall, 2006).

La metabolómica implica la detección, identificación y cuantificación de metabolitos, productos de reacciones químicas involucradas en el metabolismo (<http://uninews.unimelb.edu.au>). Su propósito es monitorear los cambios de metabolitos particulares en respuesta a un estímulo genético o ambiental. Así pueden ser utilizados como biomarcadores de salud o enfermedad y/o calidad (www.metabolomics.net.au). La metabolómica requiere de técnicas de separación de alta resolución unidas a instrumentos analíticos como los espectrómetros de masas. Cuando se combina con otros análisis de genómica funcional como la transcriptómica y la proteómica, la metabolómica ofrece gran potencial para entender todo el sistema biológico desde el genoma hasta el fenoma (<http://www.plantenergy.uwa.edu.au/metabolomics/>).

1.7 Metabolómica vegetal

La metabolómica vegetal implica un mayor reto que la de mamíferos y levaduras, ya que los genomas de las plantas típicamente contienen de 20,000 a 50,000 genes; y en la actualidad se han identificado por lo menos 50,000 metabolitos dentro del reino vegetal (Griffin, 2004). El número real de metabolitos secundarios en las plantas varía considerablemente, sin embargo, oscila entre 100,000 y 200,000 (Oksman-Caldentey e Inze, 2004).

El análisis de fuentes naturales de agentes novedosos que puedan ser farmacológicamente activos, se ha dado principalmente de extractos de plantas y ha dado como resultado el descubrimiento de fármacos útiles, que comienzan a

desempeñar papeles centrales en el tratamiento de varias enfermedades humanas (Jong Suk et al., 2005). Aunado a esto, el papel de algunos metabolitos secundarios como constituyentes de la dieta que son capaces de brindar protección a la salud, se ha convertido en un área creciente de la investigación de la nutrición humana. Existe un incremento en la evidencia de que ingerir ácidos fenólicos y flavonoides modestamente a largo plazo puede tener impactos favorables sobre la incidencia de algunos tipos de cáncer y muchas enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y diabetes Tipo II (Crozier et al., 2006).

La metabolómica ha sido empleada para el estudio de plantas sometidas a estrés por temperatura (Cook et al., 2004), agua y salinidad (Brosche et al., 2005, Cramer et al., 2007, Gong et al., 2005), azufre (Nikiforova et al., 2004), fósforo (Hernández et al., 2007), metales pesados (Le Lay et al., 2006) y estrés oxidativo (Baxter et al., 2007) así como también una combinación de estrés múltiple (Shulaev et al., 2008). El estrés en plantas puede definirse como cualquier cambio en las condiciones de desarrollo, dentro del hábitat natural de la planta, que altera o interrumpe su homeostasis metabólica (Shulaev et al., 2008). Los cambios en las condiciones de desarrollo requieren un ajuste de las rutas metabólicas, con el objetivo de alcanzar un nuevo estado de homeostasis, en un proceso que normalmente se conoce como aclimatación. Diferentes fases están involucradas en el proceso de aclimatación. En las etapas iniciales, los cambios en las condiciones ambientales son detectados por la planta y en respuesta se activa una red de rutas de señalización. En las etapas posteriores, las rutas de transducción de señales

activados inducen la producción de diferentes proteínas y compuestos que restauran o alcanzan un nuevo estado de homeostasis (Shulaev et al., 2008). De ahí la importancia de investigar la influencia de las distintas condiciones de cultivo sobre los perfiles metabólicos del amaranto.

1.8 Clasificación de los Compuestos Fenólicos

Los fenoles se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo adjuntos. Se han reportado más de 8,000 estructuras fenólicas dispersas a través del reino vegetal (Strack, 1997). El fenol es la estructura básica de ésta familia de compuestos (Figura 3), y varían de un peso molecular bajo (compuestos de un solo anillo aromático) a grandes complejos como los taninos y polifenoles derivados. Los compuestos fenólicos se encuentran comúnmente conjugados con azúcares o ácidos orgánicos (Crozier et al., 2006).

Los precursores de los compuestos fenólicos de las plantas son derivados de dos procesos catabólicos en la célula vegetal: la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. La glucólisis es el proceso durante el cual los carbohidratos generados durante la fotosíntesis son degradados a piruvato. Este proceso lleva a cabo dos funciones fundamentales, oxidar las hexosas para generar ATP, generar poder reductor y piruvato y además, produce bloques de construcción para el anabolismo. La ruta de las pentosas fosfato también puede utilizarse por la planta para degradar glucosa, sin embargo, su principal propósito es la generación de poder reductor en forma de NADPH. Además, ésta ruta provee de azúcares

intermediarios en la formación de aminoácidos aromáticos y ácidos nucleicos (Vermerris y Nicholson, 2006).

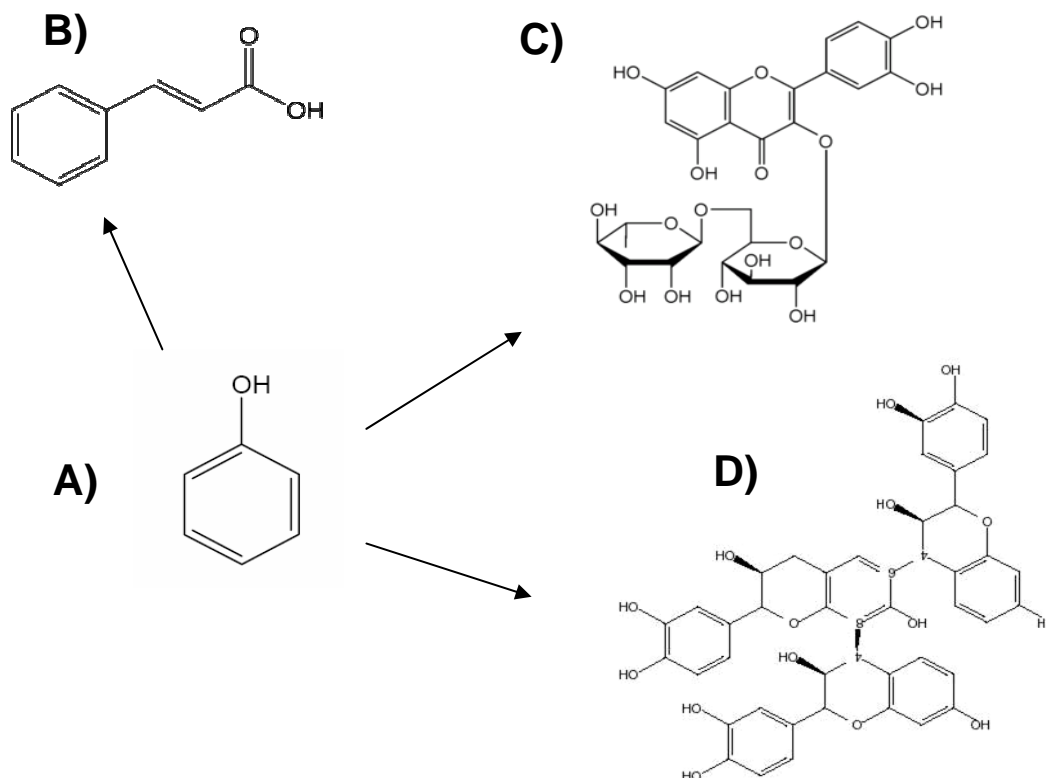


Figura 3. Estructuras representativas de algunos compuestos fenólicos. **A)** Fenol; **B)** Ácido salicílico; **C)** Un Flavonoide (rutina); **D)** Taninos condensados.

1.8.1 La ruta del ácido Shikímico

La biosíntesis de la mayoría de los fenoles comienza con los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, los cuales se sintetizan a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato por una secuencia de reacciones conocida como la ruta del ácido shikimico (Figura 4).

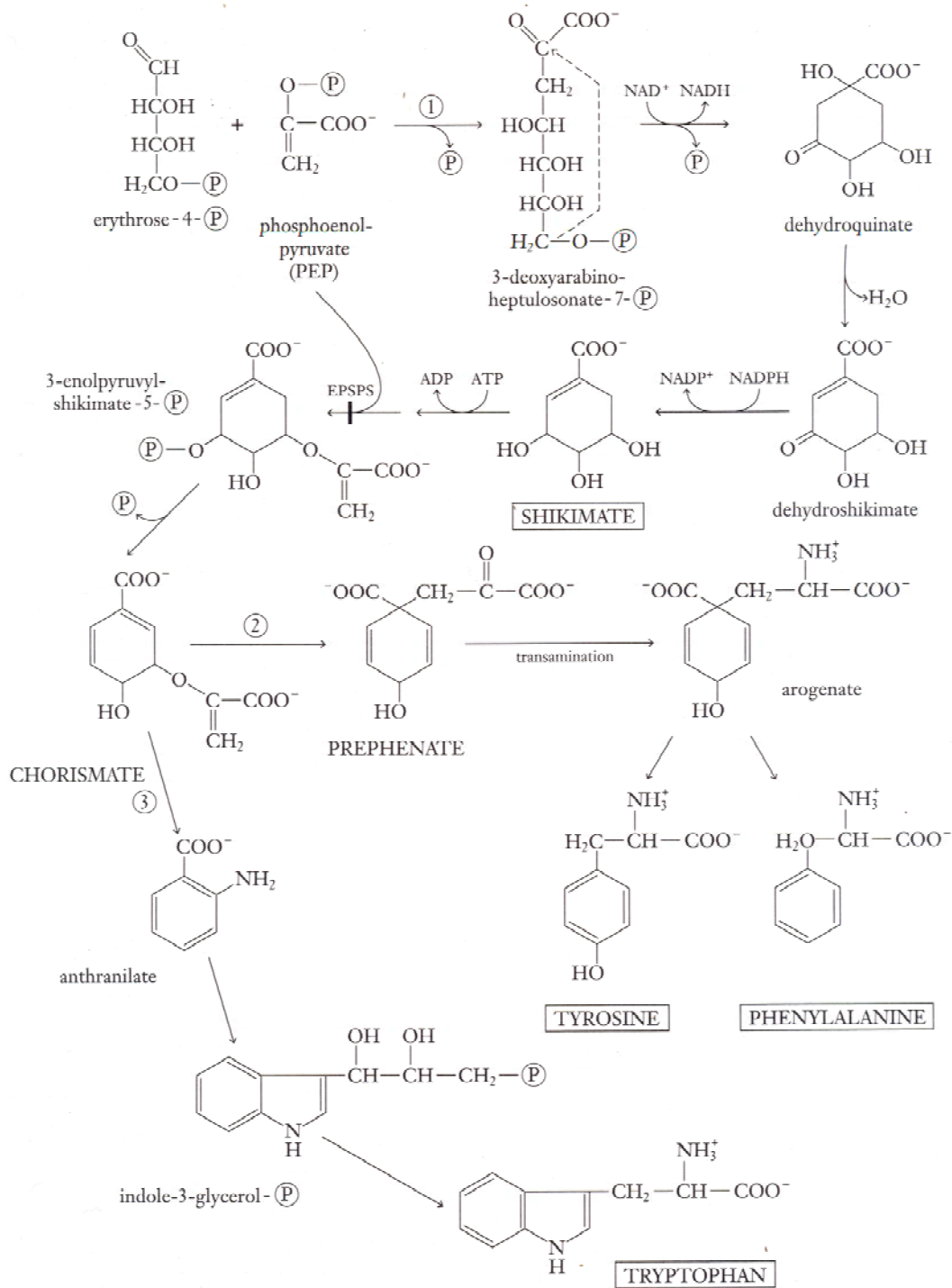


Figura 4. Ruta del Acido Shikimico (Hopkins, 1999).

La ruta del ácido shikimico se encuentra en bacterias, hongos y plantas pero no en animales. Por ello, la fenilalanina y el triptófano se encuentran dentro de los diez aminoácidos esenciales para los animales (incluidos los humanos) y representan la fuente de todas las moléculas aromáticas en los animales. La síntesis de los aminoácidos aromáticos comienza con la condensación de una molécula de eritrosa-4-P, proveniente de la ruta de la pentosa fosfato y con una molécula de PEP que proviene de la glucólisis. El resultado es un azúcar de 7 carbonos, que es entonces ciclada y posteriormente reducida para formar shikimato, molécula de donde la ruta metabólica deriva su nombre. El corismato es un punto de ramificación que por un lado, da origen a la fenilalanina, y por el otro, origina al triptófano. La ruta metabólica del ácido shikimico es un excelente ejemplo de regulación por retroalimentación. Una enzima clave, la aldolasa, cataliza la reacción inicial de condensación, la cual es inhibida por los tres productos finales. De manera similar, la conversión de corismato a prefenato es inhibida tanto por fenilalanina como por tirosina, mientras que la conversión de corismato a antranilato es inhibida por el triptófano.

Otro paso de interés, es la conversión de shikimato a 3-enol-piruvilshikimato-5-fosfato, reacción catalizada por la 3-enol-piruvilshikimato-5-fosfato sintasa (EPSPS). Esta enzima es inhibida por el herbicida *glyphosato*. Las plantas tratadas con el glifosato mueren debido a la incapacidad de sintetizar los aminoácidos aromáticos y sus derivados, especialmente proteínas (Hopkins, 1999).

Los compuestos fenólicos son productos secundarios importantes no como nutrientes de las plantas, sino como mecanismos de defensa de las plantas contra cuerpos extraños. También contribuyen al sabor, color y astringencia de las plantas. Estos compuestos fenólicos también presentan propiedades antioxidantes que les permiten capturar radicales libres en el cuerpo. Muchos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos tienen potenciales efectos benéficos en la salud humana reduciendo la incidencia de enfermedades coronarias del corazón, enfermedades de los ojos relacionadas con la edad y procesos de atherogenesis (Chitindingu et al., 2007).

1.8.2 Ácidos Fenólicos

Este grupo de compuestos se caracteriza por poseer en su estructura química el anillo aromático y el grupo hidroxilo comunes a los compuestos fenólicos y un grupo carboxílico. Los ácidos fenólicos que tienen interés terapéutico son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico (<http://www.portalfarma.com>). Los primeros (hidroxibenzóicos) se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo sustituido en un fenol (C₆-C₁), son muy abundantes en la naturaleza tanto libres, como en forma de ácidos o aldehídos (vainillal, anisaldehído) o combinados en formas heterocíclicas. Los segundos también son abundantes en la naturaleza pero en este caso se encuentran casi siempre esterificados con azúcares, alcoholes alifáticos, ácido quínico (ac. clorogénico), otros metabolitos secundarios (flavonoides) o bien acidificados (<http://www.portalfarma.com>). Existen seis ácidos cinámicos comunes (cinámico, p.cumárico, cafeico, ferúlico, 5-

hidroxiferulico y sinápico) los cuales presentan un esqueleto C₆-C₃. Todas las plantas poseen al menos tres de ellos (Vermerris y Nicholson, 2006). Los ácidos sinápico y ferulico son precursores de ligninas (Crozier et al., 2006).

Los ácidos fenólicos se sintetizan por la ruta de los fenilpropanoides (Figura 5), la cual comienza utilizando fenilalanina generada por la ruta del ácido shikimico. La fenilalanina es desaminada por la fenilalanina amonialiasa (PAL) formando el ácido cinámico. El ácido cinámico es subsecuentemente hidroxilado por la ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H) para originar al ácido p-cumárico. El ácido p-cumárico se convierte a p-cumaril CoA por la enzima ácido 4-cumárico:CoA ligasa (4CL). La ruta general de los fenilpropanoides termina con p-cumaril Coenzima A (Vermerris y Nicholson, 2006). El ácido cinámico también se metaboliza a ácido benzoico y ácido salicílico (Crozier et al., 2006).

1.8.3 Flavonoides

La mayoría de los nutraceuticos activos en las plantas son flavonoides (Lin y Weng, 2006), conocidos como polifenoles compuestos de 15 carbonos, con dos anillos aromáticos conectados entre si por medio de un puente de tres carbonos (Figura 6).

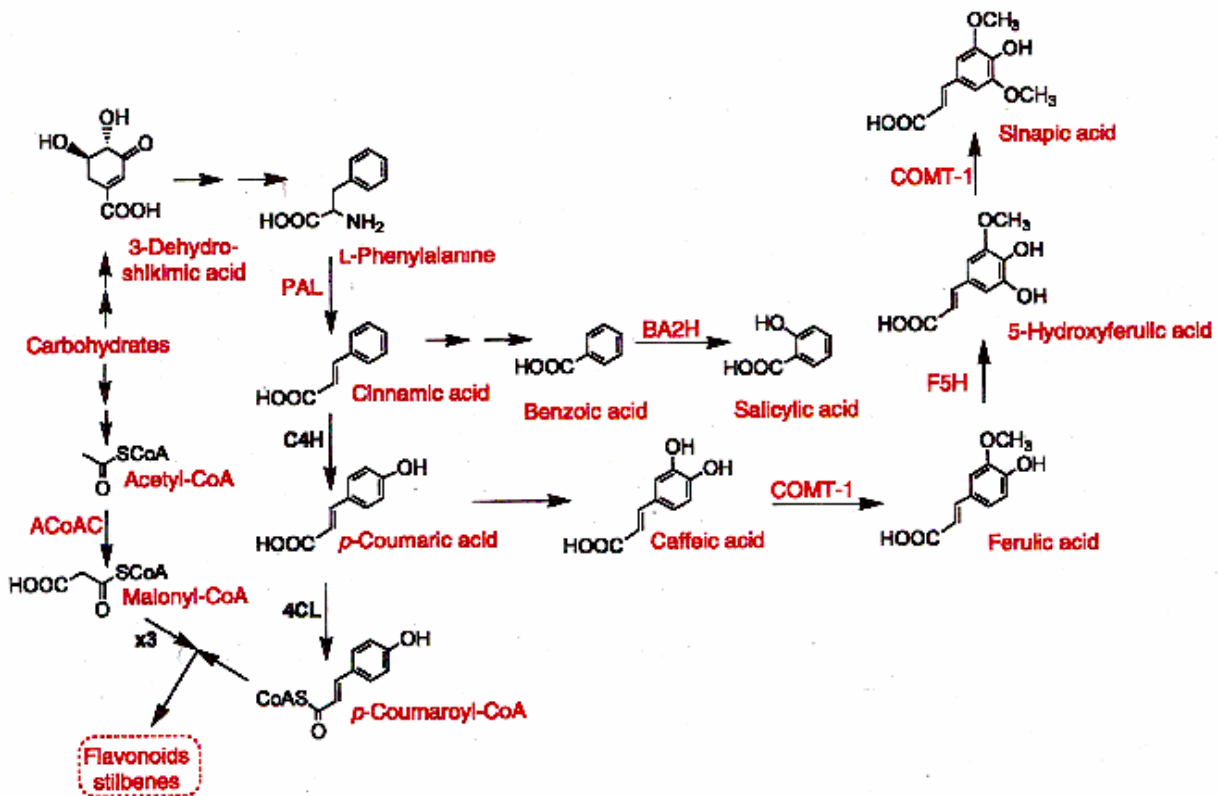


Figura 5. Ruta general de los Fenilpropanoides (Crozier et al., 2006).

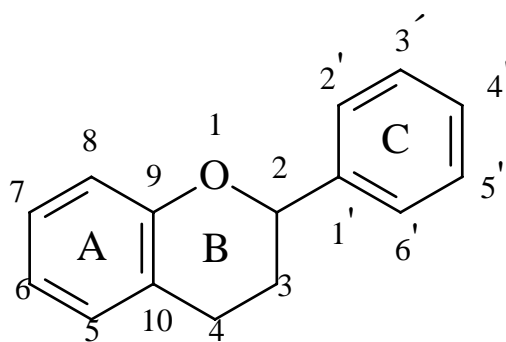


Figura 6. Estructura genérica de los flavonoides

Los flavonoides son los más numerosos de los compuestos fenólicos y se encuentran en todo el reino vegetal. Se encuentran en grandes concentraciones en la epidermis de las hojas y en la piel de las frutas. El esqueleto básico de los flavonoides puede tener numerosos substituyentes. Los grupos hidroxilo se encuentran usualmente presentes en las posiciones 4', 5 y 7. Los azúcares son muy comunes, encontrándose como glucósidos. Mientras que tanto los grupos hidroxilos y los azúcares incrementan la solubilidad en agua de los flavonoides, otros substituyentes, como grupos metilo y unidades isopentil, vuelven a los flavonoides lipofílicos (Crozier et al., 2006).

La biosíntesis de los flavonoides se inicia a partir de la condensación de p-cumaril-CoA con tres moléculas de malonyl-CoA. Ésta reacción es catalizada por medio de la chalcon sintasa (CHS) y da origen al flavanon naringenina (Figura 7).

La naringenina es convertida subsecuentemente por la flavanon 3-hidroxilasa (F3H) en el flavanonol dihidrokaempferol. Este compuesto puede convertirse por la flavon sintasa (FLS) al flavon kaempferol. Alternativamente, el anillo B del dihidrokaempferol puede substituirse por grupos hidroxilo adicionales por la flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H). Éste último producto puede convertirse en el flavon quercetina por medio de la FLS (Vermerris y Nicholson, 2006). Estudios previos han demostrado que muchos flavonoides tienen efectos de protección contra el desarrollo de ciertos cánceres, riesgo cardiovascular, enfermedades inflamatorias, enfermedades coronarias del corazón y apoplejías. Otras actividades farmacológicas también han sido atribuidas a los flavonoides,

incluyendo propiedades antimicrobianas, antioxidantes, secuestro de radicales libres, así como también efectos radio protectivos (Jong Suk et al., 2005).

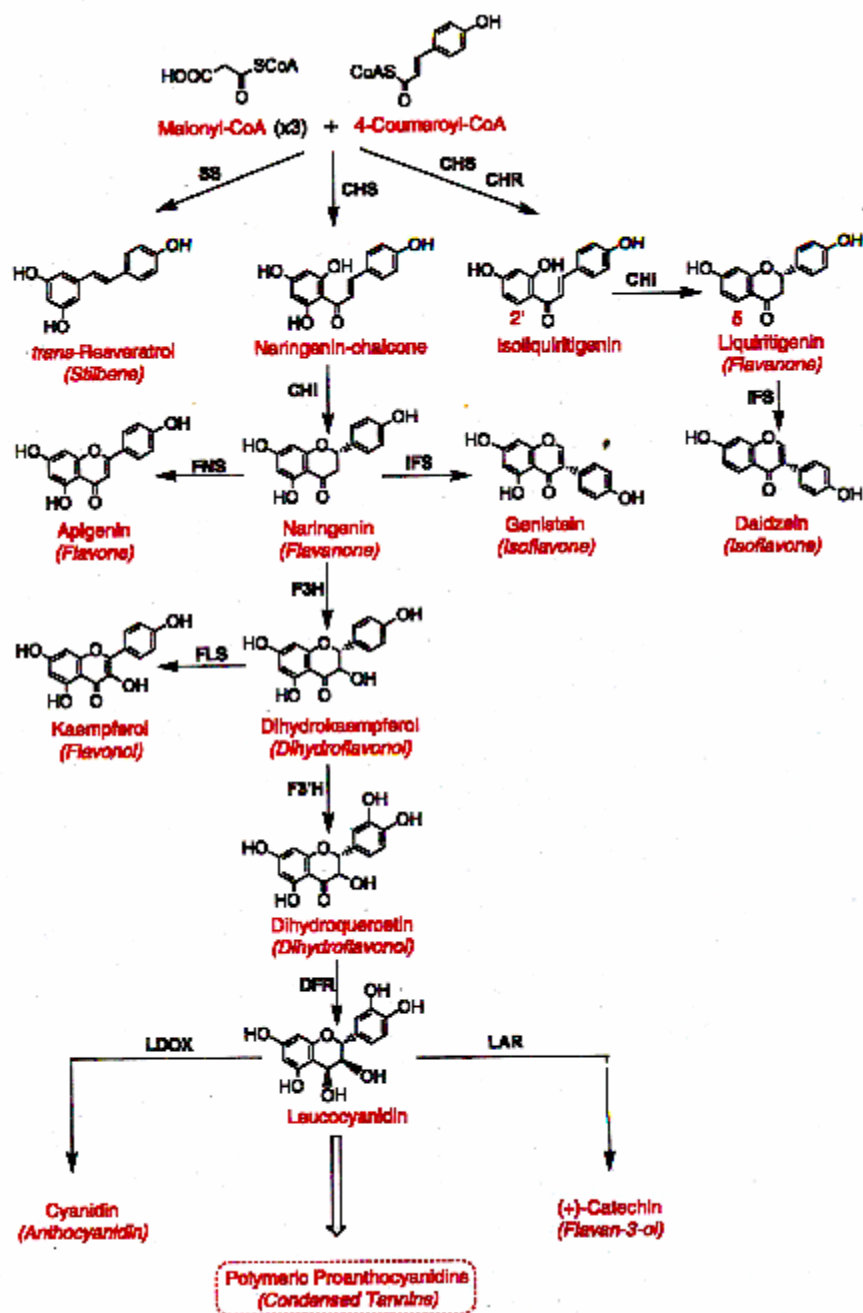


Figura 7. Biosíntesis de los Flavonoides (Crozier et al. 2006)

II. Justificación

El amaranto ha recibido atención principalmente por su gran producción de semillas y las propiedades benéficas para la salud que éstas presentan. Sin embargo, la producción de follaje por parte del amaranto también es considerable y ha recibido menos atención de parte de la comunidad científica. El estudio de las hojas de amaranto es un área prometedora debido a los antecedentes de su uso en la medicina tradicional y su rico contenido de nutrientes (www.amaranto.com.mx). Hasta ahora, no existen reportes de la composición polifenólica de las hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Los compuestos fenólicos tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de las plantas (Crozier et al., 2006) además de presentar propiedades benéficas para la salud, siendo su capacidad antioxidante y anticarcinogénica de las principales (Jong Suk et al., 2005). El análisis fue llevado a cabo con un método novedoso de extracción acelerada con solventes y separación por HPLC seguido de un análisis por espectrometría de masas el cual en la actualidad es el método más confiable para la cuantificación de metabolitos secundarios.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los flavonoides y ácidos fenólicos en Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de la variedad criolla (hojas verdes) y la variedad nutrisol (hojas rojas).

3.2 Objetivos particulares

- Cultivar plantas de ambas variedades en diferentes condiciones: dentro de invernadero (maceta pequeña y grande) y en campo abierto (sanas y atacadas por insectos).
- Colectar las hojas a los noventa días (etapa de floración) y conservarlas a -80°C hasta su liofilización.
- Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de ácidos fenólicos presentes en hojas verdes y rojas de amaranto por medio de LC/MS.
- Comparar dos métodos de extracción para los flavonoides.
- Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los flavonoides presentes en hojas verdes y rojas de amaranto por medio de LC/MS/MS.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestreo de Plantas para Análisis de Flavonoides y Ácidos Fenólicos.

Las hojas de amaranto se cosecharon a finales de julio del 2007 cuando se encontraban en la etapa de floración. Se emplearon dos variedades diferentes de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), nutrisol cuyas hojas son rojas y criolla con hojas verdes (Figura 8). Las plantas se crecieron en tres condiciones de cultivo diferentes: a) maceta pequeña en invernadero; b) maceta grande en invernadero; c) en campo. Esto se hizo con la finalidad de ver la influencia de un estrés ocasionado por falta de nutrientes y espacio para desarrollar la raíz comparado con condiciones no estresantes. Una cuarta muestra fue colectada de plantas crecidas en campo con hojas que presentaban daño por insecto. Las plantas que mostraron daño por insecto se utilizaron para analizar los cambios que pudiera haber sufrido su perfil de compuestos fenólicos debido a la interacción con los patógenos. Las hojas se colectaron a los 90 días en la etapa de florecimiento completa BBCH65 (Meier, 2001) e inmediatamente se guardaron a -80°C hasta su liofilización.

4.2 Iniciativa de Estándares Metabolómicos

La Sociedad de Metabolómica ha publicado recientemente documentos que describen los parámetros mínimos que deben ser considerados para reportar experimentos metabolómicos y se ha denominado Iniciativa de Estándares

Metabolómicos (MSI). Esto es, para validar estudios metabolómicos y para facilitar el intercambio de datos.



A)

B)

Figura 8. *Amaranthus hypochondriacus*. A) variedad Nutrisol y B) variedad Criolla.

Los parámetros de la MSI para el reporte de estudios metabolómicos incluyen el diseño del estudio biológico, la preparación de la muestra, la adquisición de los datos, el procesamiento de los datos y el análisis de datos entre otras (Fiehn et al., 2008). A continuación se presentan los parámetros utilizados para éste estudio:

Especies de la fuente biológica: *Amaranthus hypochondriacus*

Genotipo: variedades Nutrisol y Criolla

Órgano: Hoja

Especificaciones del órgano: expandida completamente

Cantidad: Se utilizó 0.1 g de muestra de las hojas previamente liofilizadas para la extracción.

Ubicación: Ambiente controlado dentro de invernadero y campos de cultivo al aire libre.

Diseño del trazo: Las macetas se colocaron en hileras separadas entre si por 1 m. En los campos se encontraban en surcos y la distancia entre si también fue de 1 m

Periodo de luz: 12 hrs al día.

Regimen Nutricional. Tierra fina mezcla especial (mezcla 3) de Sunshine, Canadá para las plantas de invernadero. Las plantas de los campos de cultivo tomaron los nutrientes del suelo.

4.3 Reactivos y Químicos

El acetonitrilo y metanol fueron grado HPLC Rathburn Chemicals Ltd (Walkerburn, Escocia); el ácido acético glacial de Merck, (Darmstadt, Alemania); los estándares kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin-3-o-rutinoside y quercetin-3-o- β -glucopyranoside de Extrasynthese, (Genay, Francia); el ácido 4-Hidroxibenzóico (pureza de 99.0%), ácido vanílico (pureza de 97%), ácido ferulico 98%, ácido p-cumarico 98%, ácido cinapico 97% y ácido salicílico 99.0%, ácido 3,4-dihidrobenzoico, ácido galico, ácido syringico, ácido caféico fueron de Sigma (Denmark).

4.4 Soluciones Estándar.

Las soluciones stock individuales para cada compuesto fenólico (10 ácidos fenólicos, ver cuadro 1 y tres flavonoides, ver cuadro 2) se prepararon disolviendo el compuesto sólido en metanol. Las concentraciones de las soluciones stock fueron 500 mg/L para cada compuesto individual. Se prepararon curvas patrón utilizando diluciones seriadas de las soluciones stock en las siguientes concentraciones: 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400 y 800 µg/L. Las soluciones stock finales de los flavonoides para la curva patrón se prepararon en 50% metanol y 50% agua (v/v). Las soluciones stock finales de los ácidos fenólicos se prepararon en 7% acetonitrilo/H₂O (v/v) con 20 mM de ácido acético. La curva estándar se utilizó para la determinación cuantitativa.

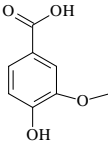
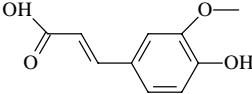
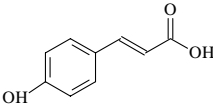
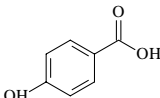
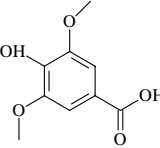
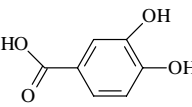
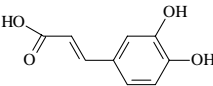
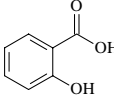
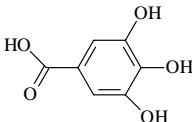
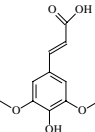
4.5 Extracción de Ácidos Fenólicos y Flavonoides.

4.5.1 Extracción Acelerada con Solventes.

Las muestras liofilizadas se homogeneizaron en una licuadora Waring y la extracción de ácidos fenólicos de flavonoides se llevó a cabo con el Sistema de Extracción Acelerada con Solventes 200 de Dionex (ASE). Se adicionaron 5 g de arena Ottawa, encandecida, químicamente inerte tamaño de la partícula 20-30 mesh (Fisher Chemicals) a las celdas de extracción de 33 ml. Posteriormente, se agregó 0.1 g de muestra liofilizada y homogeneizada a las celdas de extracción y se adicionaron otros 5 g de arena. Se colocó un filtro en la parte superior de la

muestra. La celda de extracción se llenó con perlas de vidrio previamente esterilizadas. El eluente utilizado para los flavonoides fue 70% MeOH/H₂O (v/v) y para los ácidos fenólicos fue 80% MeOH/1% ácido acético /H₂O (v/v). El protocolo para la extracción con ASE fue el siguiente: pre-calentamiento por 5 min, calentamiento por 5 min, estático por 3 minutos, 80% de volumen de flujo, purga por 60 seg, 4 ciclos, 1500 PSI de presión y temperatura a 40°C para los flavonoides y para los ácidos fenólicos fue lo mismo con la excepción de una temperatura de 80°C. Los extractos se colectaron en viales los cuales se rellenaron con eluente para mantener el peso de 46.1 g para los extractos de flavonoides y 42.9 g de peso para los extractos de ácidos fenólicos. Se guardaron a -20°C hasta el análisis.

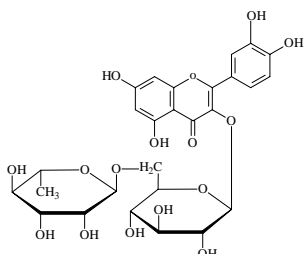
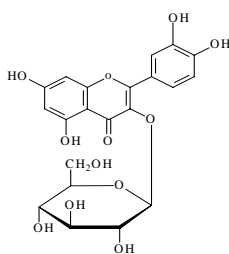
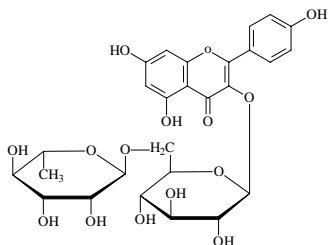
Cuadro 1**Estructuras de los fenoles analizados en hojas de amaranto**

Nombre corto	Nombre sistemático	Fórmula estructural	# Cas	Masa molar	Detección en LC/MS
Ácido vanillico	ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico		121-34-6	168.15	Mass: 167 TR: 9.9 min
Ácido ferulico	ácido 3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico		1135-24-6	194.19	Masa: 193 TR: 17.1 min
Ácido p-coumarico	(E)-3(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid		501-98-4	164.16	Masa: 163 TR: 15.1 min
Ácido 4-Hydroxybenzoico	ácido 4-hidroxibenzoico		99-96-7	138.12	Masa: 137 TR: 9.0 min
Ácido Syringico	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid		530-57-4	198.175	Masa: TR: 10.4 min
Ácido Protocatecuico	3,4-Dihydroxybenzoic acid		99-50-3	154.122	Masa: TR: 6.7 min
Ácido Cafeico	3,4-Dihydroxycinnamic acid		331-39-5	180.1598	Masa: TR: 10.8
Ácido Salicílico	2-Hydroxybenzoic acid		69-72-7	138.1226	Masa: TR: 22.3
Ácido Gallico	3,4,5-Trihydroxybenzoic acid		149-91-7	170.1214	Masa: TR: 5.2
Ácido Sinapico	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid		530-59-6	224.2128	Masa: TR: 21.9

CAS=Chemical Abstracts Service. División de la American Chemical Society

Cuadro 2

Estructuras de los flavonoides analizados en hojas de amaranto

Nombre corto	Nombre sistemático	Fórmula estructural	# Cas	Masa molar	Detección en LC/MS/MS
Rutina	Quercetina-3-O-rutinosido		153-18-4	610.51	611.0/302.9 TR: 10.1 min
Iso-quercetrina	Quercetina-3-O-β-rutinosido		482-35-9	464.38	465.0/302.8 TR: 13.1 min
Nicotiflorin	Kaempferol-3-O-rutinosido		17650-84-9	594.53	595.1/286.9 TR: 15.1 min

CAS=Chemical Abstracts Service. División de la American Chemical Society

4.5.2 Extracción por Agitación.

Las muestras liofilizadas se homogeneizaron en una licuadora Waring antes de transferir 0.1 g de cada muestra a un tubo falcon de 50 ml. Posteriormente se agregaron 5 g de arena Ottawa calentada, químicamente inerte (tamaño de partícula 20-30 mesh, Fisher Chemicals) y después 25 ml de 70% MeOH/H₂O. Los tubos se rotaron durante 2 horas. Después, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min a 20⁰C. Se recuperó el sobrenadante, se adicionaron otros 25 ml y las muestras se pusieron a rotar una hora más. Se centrifugaron en las mismas condiciones, se recuperó el sobrenadante y se guardó en frascos ámbar a -20⁰C hasta su análisis.

4.6 Análisis Químico de Ácidos Fenólicos y de Flavonoides.

Para el análisis de los ácidos fenólicos se utilizó el cromatografo de líquidos HP-1100 series acoplado al espectrómetro de masas (LC/MS) Agilent Technologies en modo negativo con una cámara de ionización a presión atmosférica (API-ES). La separación cromatográfica se realizó con un flujo promedio de 200 µl/min a 35 °C con un volumen de inyección de 50 µl. Se utilizó una columna Synergi 4u Fusion-RP 80A. El eluente A contenía 7% de acetonitrilo (ACN) con 20 mM de ácido acético y el eluente B contenía 78% de ACN con 20 mM de ácido acético. El gradiente contenía lo siguiente: 12 min para llegar de 15% de B a 20% del mismo, seguido de 3 min para llegar a 25% de B y después 3 min de un gradiente lineal de 25% de B y subsecuentemente 4 min para regresar a 15% de B.

Los extractos de flavonoides se filtraron a través de un filtro de membrana con PTFE 0.45 μm (Sartorius SRP 15) y se diluyeron con agua en una proporción 1:1. Para los extractos de ácidos fenólicos se utilizó el mismo filtro y se diluyeron en 7% acetonitrilo/ H_2O con 20 mM de ácido acético en una proporción 1:1. Para el análisis de los flavonoides se empleó el cromatógrafo de líquidos 1100 (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (LC/MS/MS) MDS Sciex API 2000 (Applied Biosystems) con ionización por turbo electrospray en modo positivo de multiple monitoreo de reacciones. La separación cromatográfica se realizó con un flujo de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 30°C con un volumen de inyección de 20 μl . Se utilizó una columna (Phenomenex), Synergi 4y Fusion-RP 80A de 260 mm x 2.00 mm. El eluente A contenía 7% de acetonitrilo y 93% de agua milliQ (v/v) con 20 mM de ácido acético glacial. El eluente B contenía 78% de acetonitrilo y 22% de agua milliQ con 20 mM de ácido acético glacial. El gradiente se inició con: 79% de A por 19 min, seguido de 3 min de 40% de A y 60% de B seguido de 12 min con 100% de B para equilibrarse y 10 min de 79% de A y 21% de B. El tiempo total de corrida de este análisis fue de 46 min.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la identificación de flavonoides y ácidos fenólicos se utilizaron compuestos de referencia con base en la comparación de sus patrones de fragmentación y sus tiempos de retención (Tablas 1 y 2). Se aplicó una función cuadrática a las curvas patrón con un coeficiente de $1/x$ debido a que había más puntos de datos en la parte baja de la curva cuyo coeficiente de correlación fue > 0.99 (Figuras 9, 10 y 11). Los cálculos se basaron en dos réplicas con la misma concentración.

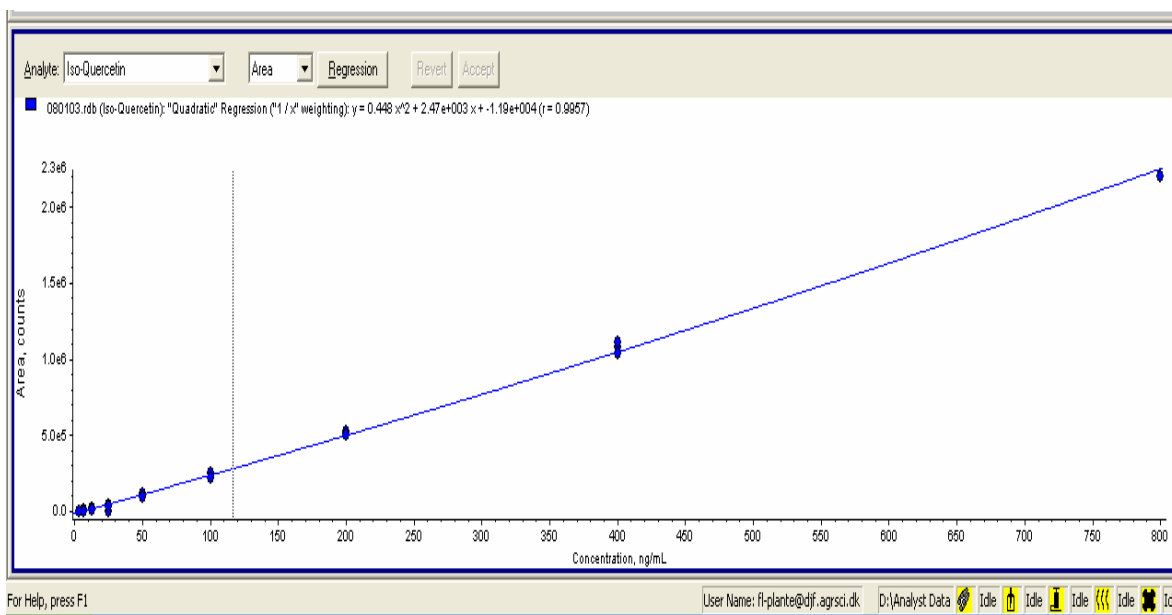


Figura 9. ASE. Curva patrón de iso-quercetina utilizada para la determinación cuantitativa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución stock de iso-quercetina (500 mg/L) con las siguientes concentraciones: 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/L}$. $r = 0.9957$.

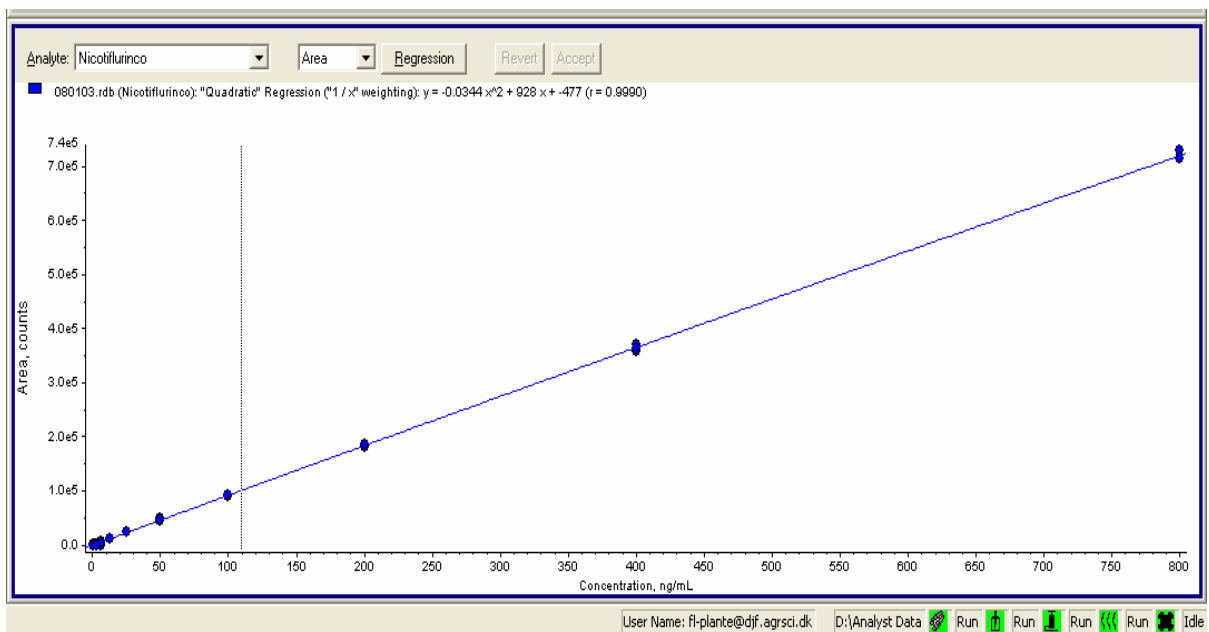


Figura 10. ASE. Curva patrón de nicotiflorin utilizada para la determinación cuantitativa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución stock de nicotiflorin (500 mg/L) con las siguientes concentraciones: 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/L}$. $r = 0.9990$.

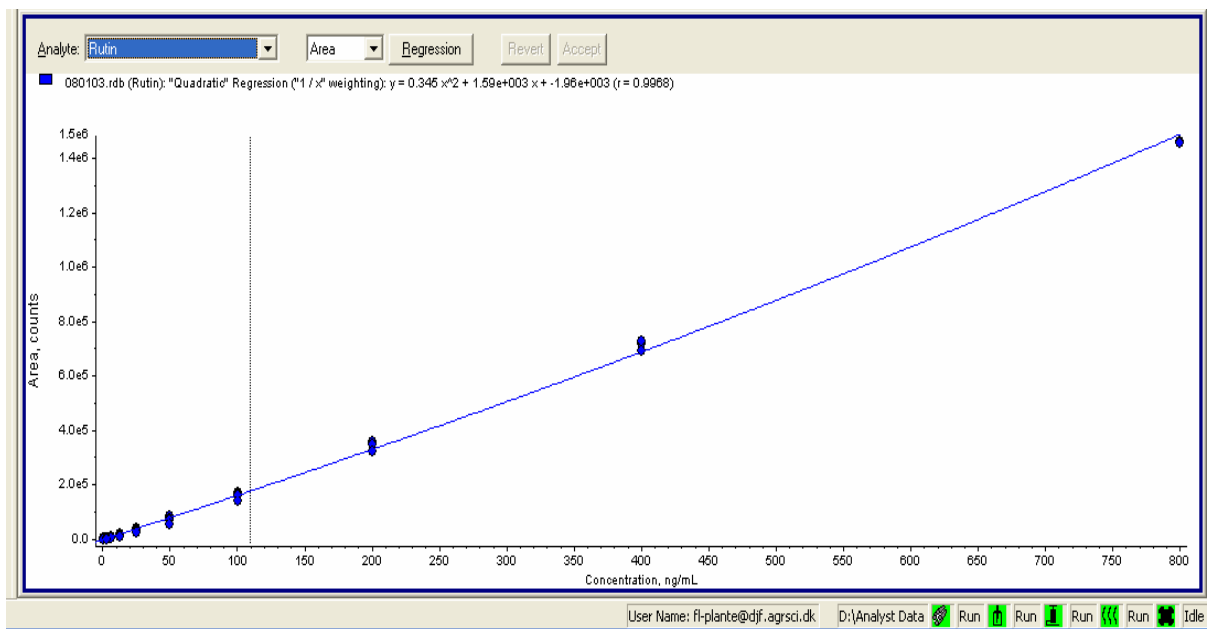


Fig. 11 ASE. Curva patrón de rutina utilizada para la determinación cuantitativa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución stock de rutina (500 mg/L) con las siguientes concentraciones: 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/L}$. $r = 0.9968$.

En las hojas de amaranto se detectaron 5 ácidos fenólicos: ferúlico, cumárico, cafeico, 4-hidroxibenzoico y salicílico (Cuadro 1) y tres flavonoides: rutina, nicotiflorin e iso-quercetina (Cuadro 2). Aunque se buscaron los ácidos fenólicos vanílico, p-cumárico, siríngico, protocatecúico y sinápico, no se detectaron (Cuadro 2).

5.1 Contenido de ácidos fenólicos en hojas de amaranto.

En general, las hojas de la variedad nutrisol (rojas) presentaron mayores concentraciones de ácidos fenólicos que las hojas de la variedad criolla (verdes). Además, en las plantas de hojas rojas, los ácidos se detectaron en todas las condiciones de cultivo (Cuadro 3).

5.1.1 Ácidos p-Cumárico y Ferúlico

El ácido p-cumárico únicamente se detectó en hojas verdes de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero con una concentración de 0.7 $\mu\text{g/g}$ (Figura 12). De igual manera, el ácido ferúlico se detectó en una sola condición de cultivo, en plantas de hoja roja cultivadas en maceta chica en invernadero, con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/g}$ (Figura 13; Cuadro 3). Estos resultados confirman la capacidad del método para la cuantificación de niveles bajos de ácidos fenólicos y concuerda con datos previos acerca de la concentración baja de este tipo de compuestos en las plantas en general (Vermerris y Nicholson, 2006). La hidroxilación del ácido p-cumárico a ácido cafeico es un paso importante en la

biosíntesis de ligninas, flavonoides y cumarinas en plantas superiores (McIntyre y Vaughan, 1975). El ácido ferúlico participa también en la formación de ligninas al ser un precursor del alcohol coniferil del que se sabe es uno de los principales constituyentes de la lignina (Boerjan W. et al., 2003). Además, el ácido ferúlico ayuda a prevenir el daño celular causado por la luz ultravioleta. De hecho, la exposición a luz ultravioleta incrementa la potencia antioxidante de éste ácido. La principal fuente de ácido ferúlico parece ser el café, que provee aproximadamente 10 mg de éste ácido. El ácido ferúlico también se encuentra en cereales (Donovan et al., 2006). El ácido p-cumárico tiene la habilidad de proteger células de mamífero en cultivo en contra de estrés oxidativo y genotoxicidad. En dosis equitoxicas, su actividad es igual o superior a aquella del conocido anticarcinogeno curcumin.. Por sus propiedades antioxidantes el ácido ferúlico es añadido comúnmente como ingrediente en los suplementos antienvjecimiento (<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/ferulic-acid.php>).

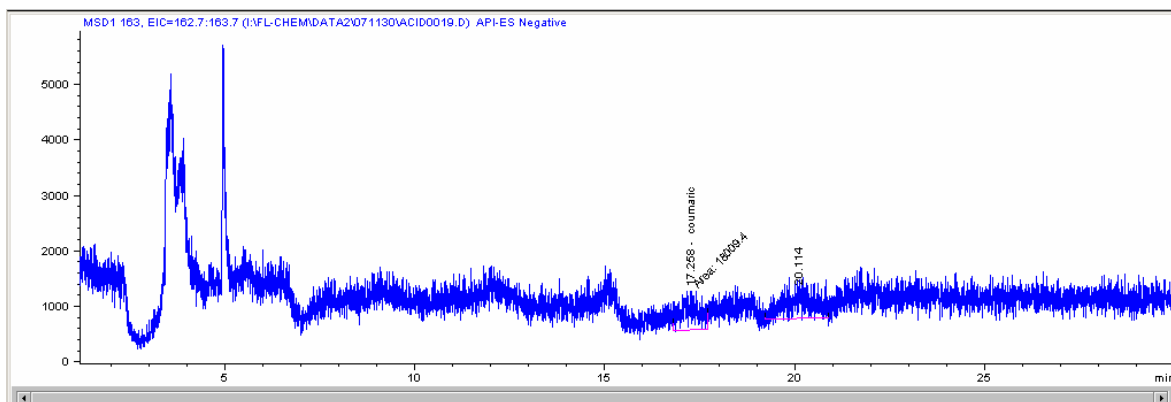


Figura 12. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectaron 0.7 µg/g de ácido p-cumárico.

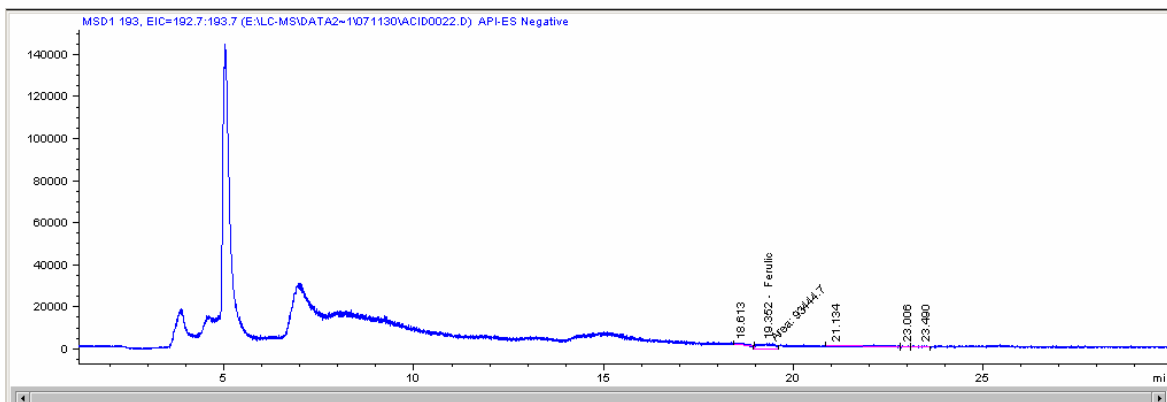


Figura 13. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas crecidas en maceta pequeña en invernadero donde se detectaron 0.5 $\mu\text{g/g}$ de ácido ferúlico.

5.1.2 Ácido Cafeico

Como se muestra en el cuadro tres, el ácido cafeico fue detectado en las hojas de ambos colores de plantas cultivadas en campo abierto, tanto en las sanas (rojas 33.3 $\mu\text{g/g}$ y verdes 29.9 $\mu\text{g/g}$) como en las que mostraban daño por insecto, siendo la concentración de las hojas rojas de 34.6 $\mu\text{g/g}$ y 30.5 $\mu\text{g/g}$ la concentración de las hojas verdes. Este ácido también se detectó en las hojas rojas de plantas crecidas en maceta grande dentro de invernadero a una concentración de 25.6 $\mu\text{g/g}$ (Figuras 14-18). El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre la producción de ácido cafeico dentro y fuera del invernadero en las plantas de hojas rojas (Cuadro tres). Las concentraciones de ácido cafeico de ambos tipos de hoja en las diferentes condiciones de cultivo son las más altas de los ácidos detectados, coincidiendo con la literatura donde se reporta que el ácido cafeico, libre o esterificado, representa el 75 al 100% del

contenido total de ácidos hidroxicinámicos en la mayoría de las plantas (Donovan J.L. et al., 2006). Este ácido es un antioxidante que neutraliza radicales libres (superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo) que pueden causar daño oxidativo a las membranas celulares y al DNA. Kuenzig et al. (1984) mostraron que los ácidos cafeico y ferúlico pueden tener un papel en la defensa del cuerpo contra la carcinogénesis inhibiendo la formación de compuestos N-nitrosos. En la figura 12 se muestra el cromatograma de HPLC/MS realizado a la muestra de hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto donde se detectaron 29.9 µg/g de ácido cafeico.

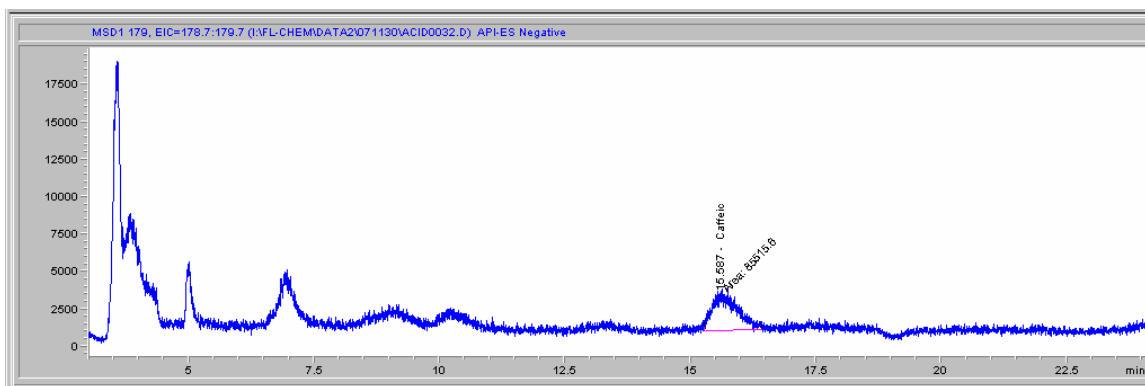


Figura 14. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto donde se detectaron 29.9 µg/g de ácido cafeico.

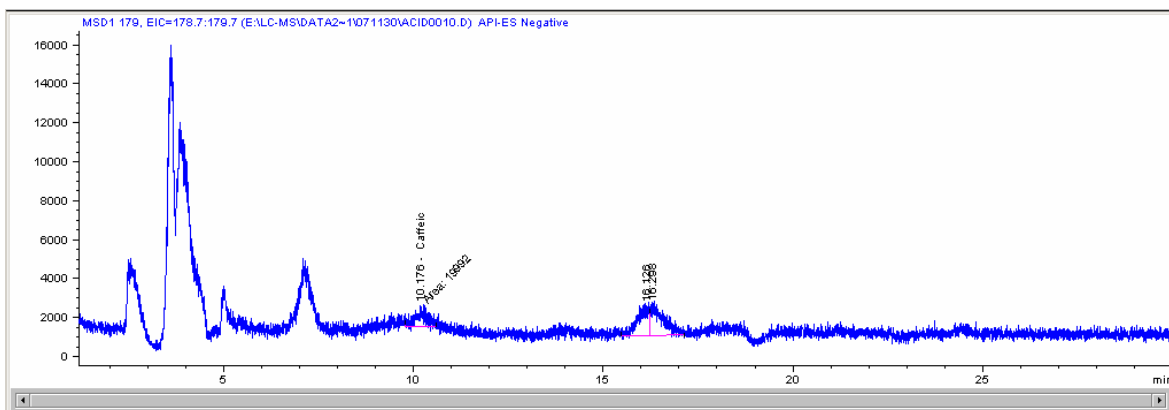


Figura 15. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto mostrando daño por insecto donde se detectaron $30.5 \mu\text{g/g}$ de ácido cafeico.

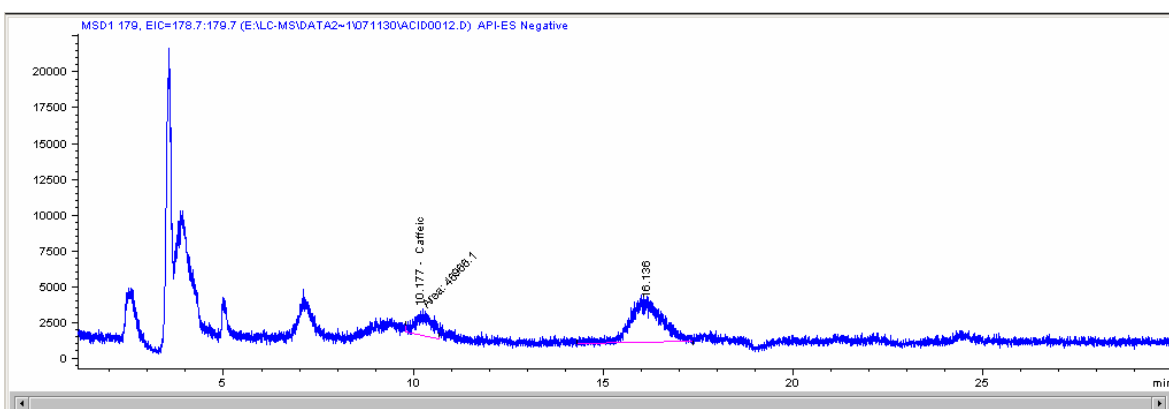


Figura 16. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas crecidas en campo abierto donde se detectaron $33.3 \mu\text{g/g}$ de ácido cafeico.

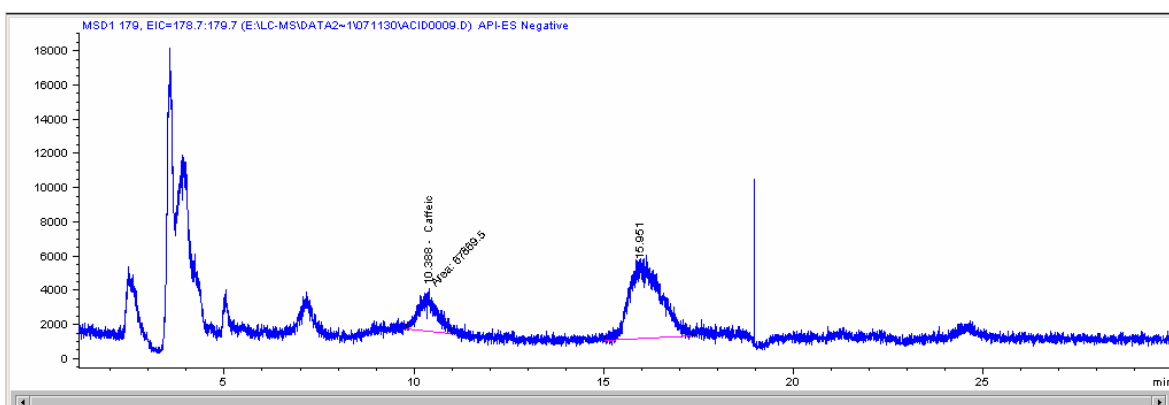


Figura 17. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas crecidas en campo abierto mostrando daño por insecto donde se detectaron $34.6 \mu\text{g/g}$ de ácido cafeico.

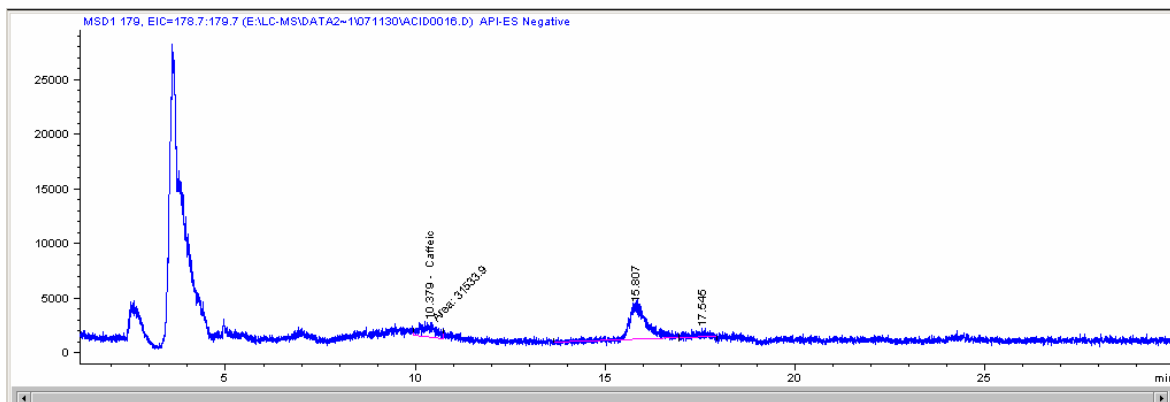


Figura 18. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectaron 25.6 $\mu\text{g/g}$ de ácido cafeico.

5.1.3 Ácido 4-Hidroxibenzoico

El ácido 4-hidroxibenzoico se detectó en ambos tipos de hojas de plantas cultivadas tanto dentro como fuera del invernadero (Cuadro 3). En las hojas verdes se logró detectar en plantas cultivadas en maceta grande en invernadero y en hojas de plantas cultivadas en campo abierto en concentraciones de 6.6 y 5.1 $\mu\text{g/g}$ respectivamente (Figuras 19 y 20). En las hojas rojas el ácido 4-hidroxibenzoico se detectó en macetas pequeñas y grandes dentro de invernadero en concentraciones de 10.2 y 0.2 $\mu\text{g/g}$ correspondientemente (Figuras 21 y 22). Además, se logró detectar en plantas de hojas rojas cultivadas en campo que mostraban daño por insecto a una concentración de 9.9 $\mu\text{g/g}$ (Figura 23). Es de llamar la atención que en las hojas verdes el ácido 4-hidroxibenzoico se detectó y cuantificó en las plantas cultivadas sin estrés, es decir, en las plantas crecidas en maceta grande en invernadero y campo abierto, mientras que en las hojas rojas el

ácido se detectó en las condiciones de cultivo sometidas a estrés, macetas chicas en invernadero y campo abierto con daño por insecto.

Cuadro 3

Contenido de ácidos fenólicos en hojas rojas y verdes de *Amaranthus hypochondriacus* cultivados en distintas condiciones

	Acido ($\mu\text{g/g}$)				
	p-cúmarico	cafeico	ferúlico	4-HB	salicílico
Hojas verdes					
Macetas pequeñas en invernadero	0	0	0	0	0
Macetas grandes en invernadero	0.7 ^a	0	0	6.6 ^b	0
Campo abierto	0	29.9 ^{a, b}	0	5.1 ^b	0
Campo abierto (con daño de insectos)	0	30.5 ^{a, b}	0	0	0.9 ^a
Hojas rojas					
Macetas pequeñas en invernadero	0	0	0.5 ^a	10.2 ^a	0.5 ^{b, c}
Macetas grandes en invernadero	0	25.6 ^b	0	0.2 ^c	0.7 ^a
Campo abierto	0	33.3 ^{a, b}	0	0	0
Campo abierto (con daño de insectos)	0	34.6 ^a	0	9.9 ^a	0.8 ^a

Promedio de dos repeticiones, las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas a $P \leq 0.05$. 4-HB= Ácido 4-hidroxibenzoico.

Se sabe que el ácido 4-hidroxibenzoico es utilizado por algunas plantas como un aleloquímico que puede ser tóxico para otras plantas con quien comparten el hábitat como las malezas (Yongqing, 2005), además de que se ha asociado con actividad antimicrobiana (Dey et al., 2005). Sus ésteres, también llamados parabenos, son utilizados como agentes antimicrobianos en una gran variedad de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos debido a su excelente actividad antimicrobiana y baja toxicidad (Valkova et al., 2001). A Continuación se muestra el cromatograma de HPLC/MS realizado a la muestra de hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto donde se detectaron 5.1 µg/g.

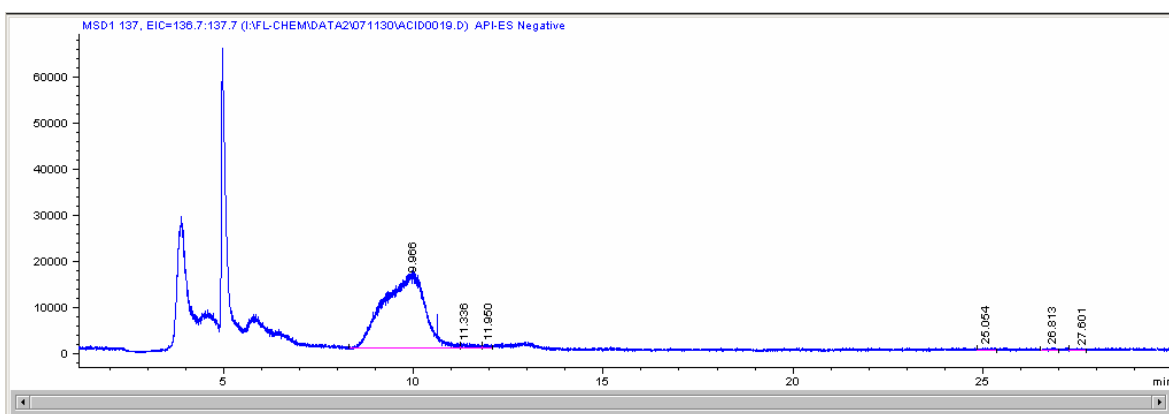


Figura 19. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectaron 6.6 µg/g de ácido 4-hidroxibenzoico.

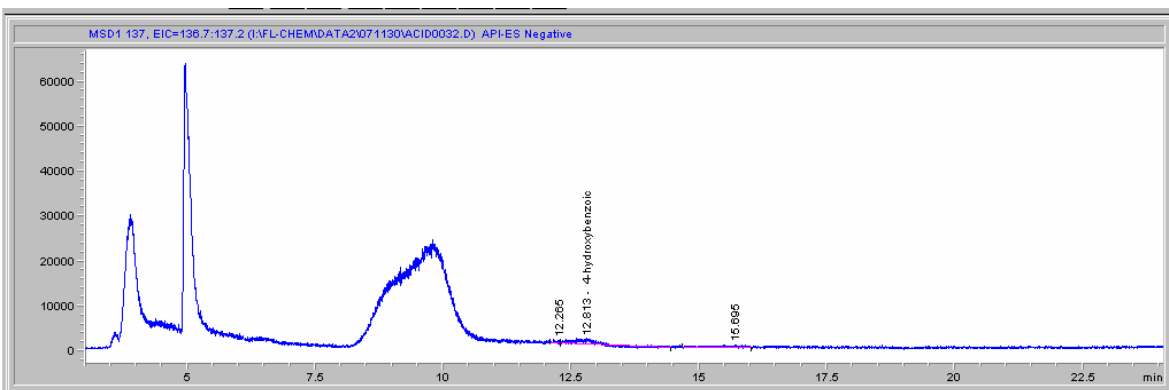


Figura 20. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas crecidas en campo abierto donde se detectaron 5.1 µg/g de ácido 4-hidroxibenzoico.

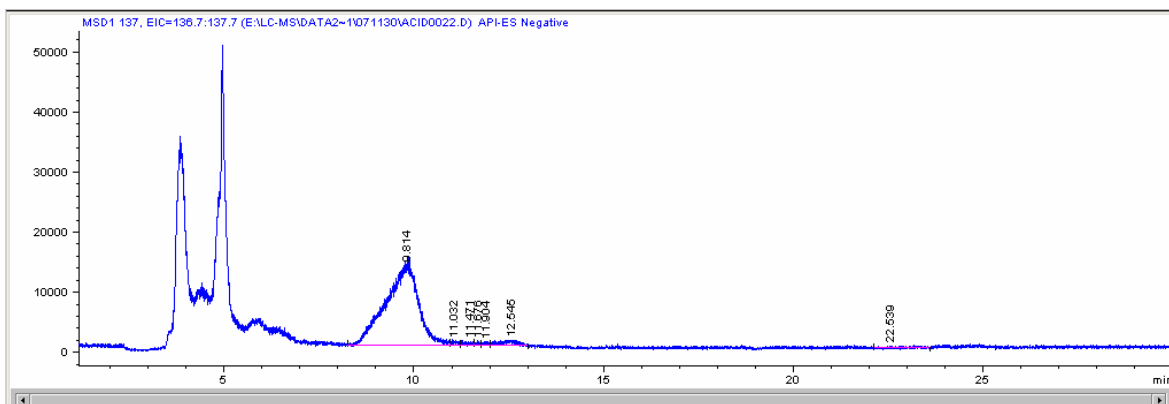


Figura 21. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta pequeña en invernadero donde se detectaron 10.2 $\mu\text{g/g}$ de ácido 4-hidroxibenzoico.

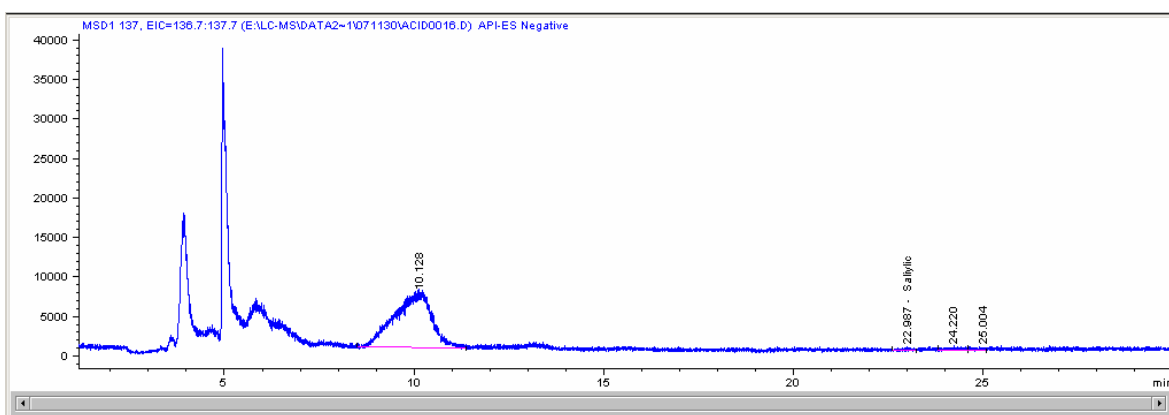


Figura 22. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectaron 0.2 $\mu\text{g/g}$ de ácido 4-hidroxibenzoico.

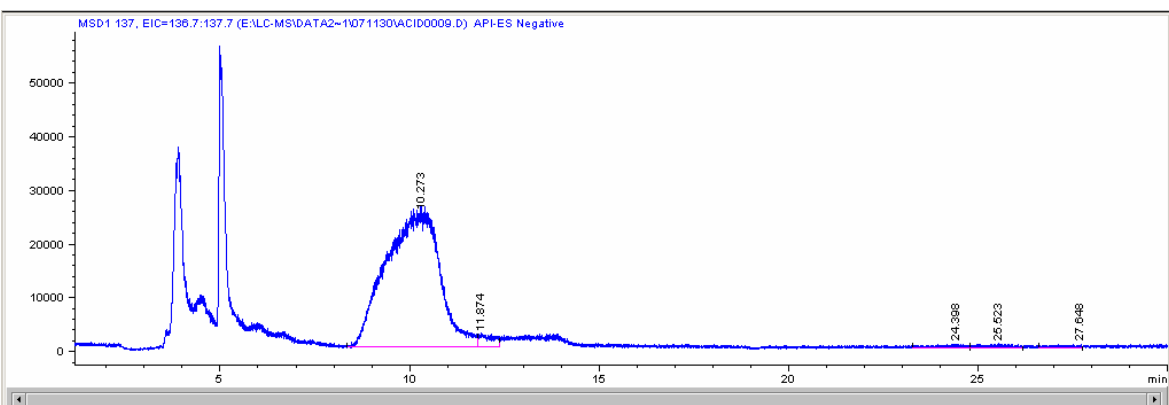


Figura 23. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas campo mostrando daño por insecto donde se detectaron 9.9 $\mu\text{g/g}$ de ácido 4-hidroxibenzoico.

5.1.4 Ácido Salicílico

El ácido salicílico (AS) se detectó en hojas verdes en una sola condición de cultivo, campo abierto mostrando daño por insecto, a una concentración de 0.9 $\mu\text{g/g}$ (Figura 24). En las hojas rojas el ácido salicílico se logró detectar en tres condiciones de cultivo: en maceta pequeña y grande dentro de invernadero (Figuras 25 y 26) y cultivadas en campo abierto mostrando daño por insecto (Figura 27), con sus respectivas concentraciones de 0.5, 0.7 y 0.8 $\mu\text{g/g}$. Se puede observar en estos resultados que la mayor producción de ácido salicílico se encontró en las hojas de las plantas que fueron atacadas por insectos. Durante la evolución, las plantas han desarrollado sofisticadas estrategias de defensa para percibir el ataque de patógenos y para traducir ésta percepción en una respuesta adaptativa apropiada. Investigaciones previas han demostrado que el ácido salicílico se produce rápidamente en algunas plantas como una molécula señal que inicia respuestas de defensa posteriores al ataque por insectos, hongos, bacterias y virus (Crozier et al., 2006). Los niveles de ácido salicílico se han monitoreado en frutas, verduras, hierbas, especias y bebidas (Venema et al., 1996). Sin embargo, el ácido salicílico no se detectó en ninguna de las muestras con la excepción de algunas hierbas y especies como la canela (*Cinnamomum zeylandicum*), orégano (*Origanum vulgare*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). Los niveles de ácido salicílico fueron menores a 1 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco. Se piensa que los niveles de salicilatos presentes en la mayoría de las dietas son demasiado bajos para tener algún impacto en la salud (Janssen et al., 1996). El uso de cultivos que contengan niveles elevados de AS es algo que pudiera lograrse por

medio de ingeniería genética. Este tipo de cultivos ofrecería dos ventajas: primero, las mismas plantas serían más resistentes a patógenos y segundo, los consumidores tendrían una menor propensión a sufrir infartos al corazón y trombosis cerebral debido a que el AS, al igual que la aspirina, retardaría la producción de prostaglandinas las cuales promueven la coagulación de la sangre (Crozier et al., 2006).

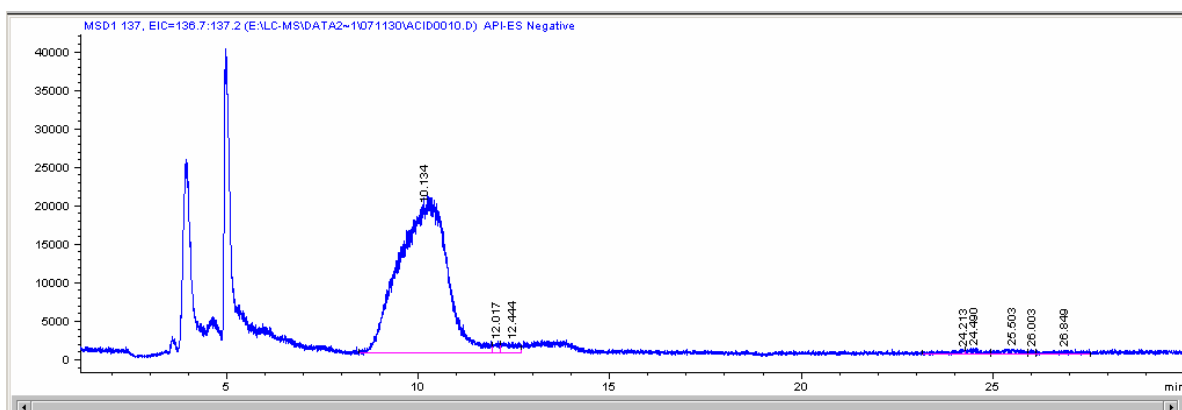


Figura 24. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas verdes de plantas cultivadas campo mostrando daño por insecto donde se detectaron 0.9 $\mu\text{g/g}$ de ácido salicílico.

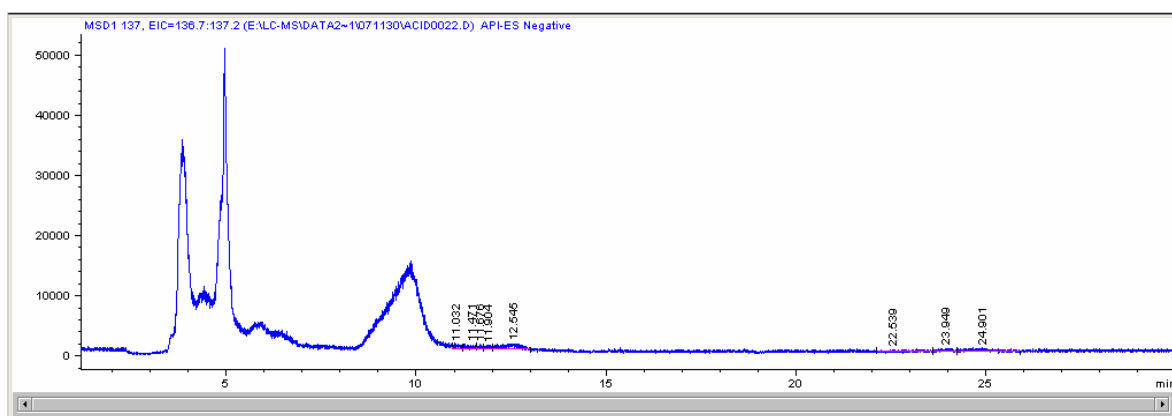


Figura 25. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta pequeña en invernadero donde se detectaron 0.5 $\mu\text{g/g}$ de ácido salicílico.

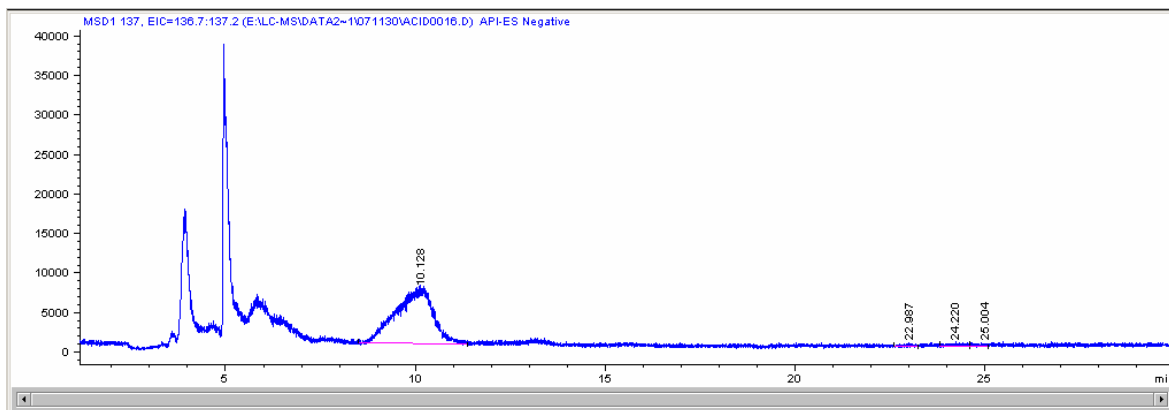


Figura 26. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en maceta grande en invernadero donde se detectaron 0.7 $\mu\text{g/g}$ de ácido salicílico.

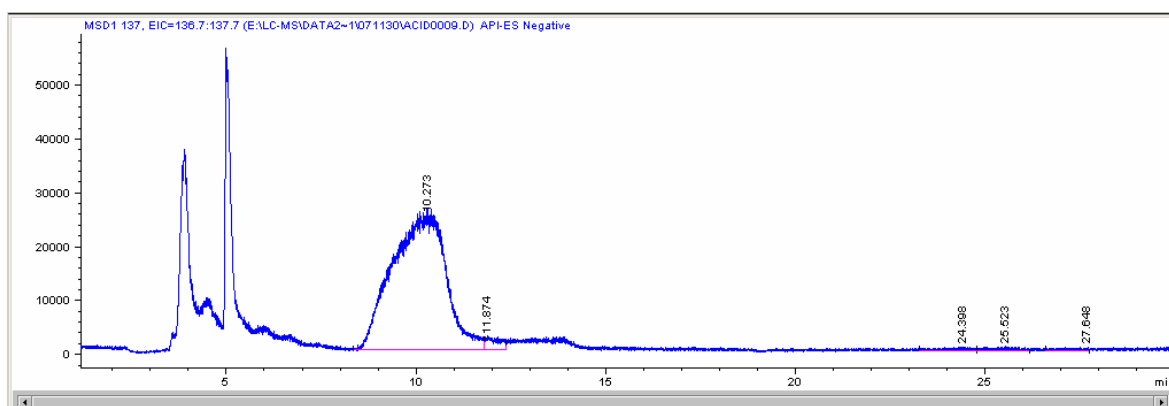


Figura 27. Cromatograma de HPLC/MS con Atmospheric Pressure Ionization-Electro Spray (API-ES) en modo negativo realizado a hojas rojas de plantas cultivadas en campo con daño por insecto donde se detectaron 0.8 $\mu\text{g/g}$ de ácido salicílico.

Las plantas cultivadas en campo abierto tuvieron a su disposición todo el espacio y nutrientes necesarios para poder desarrollarse por lo que es probable que las rutas metabólicas se orientaran hacia la producción de ligninas necesarias para formar la pared celular, la cual además de dar soporte a la planta ayuda a la impermeabilidad de los haces vasculares, indispensable para el transporte de nutrientes tanto en el xilema como en el floema. Las plantas cultivadas en maceta grande dentro de invernadero también tuvieron todas las condiciones adecuadas

para tener un buen desarrollo (suficiente espacio, nutrientes, etc.) lo que puede explicar el porque de la alta producción de ácido cafeico en ambas condiciones. Las bajas concentraciones en las que se encontraron algunos de los ácidos (cumárico, 4-hidroxibenzoico y salicílico) en determinadas condiciones de cultivo nos muestra que un buen método en el uso del HPLC/MS es efectivo para la cuantificación de este tipo de compuestos.

5.2 Contenido de Flavonoides en Hojas de Amaranto

5.2.1 Comparación del método de extracción

El novedoso método de extracción acelerada con solventes (ASE) fue comparado con el método de extracción tradicional liquido/liquido. El método de extracción no tuvo influencia en la concentración de flavonoides extraídos (Figuras 28). El principal flavonoide detectado fue la rutina y el contenido más alto se encontró en las hojas de la variedad criolla (Figura 29 A y B). Por esto, el método elegido para el análisis fitoquímico de las hojas de amaranto fue la extracción acelerada con solventes (ASE).

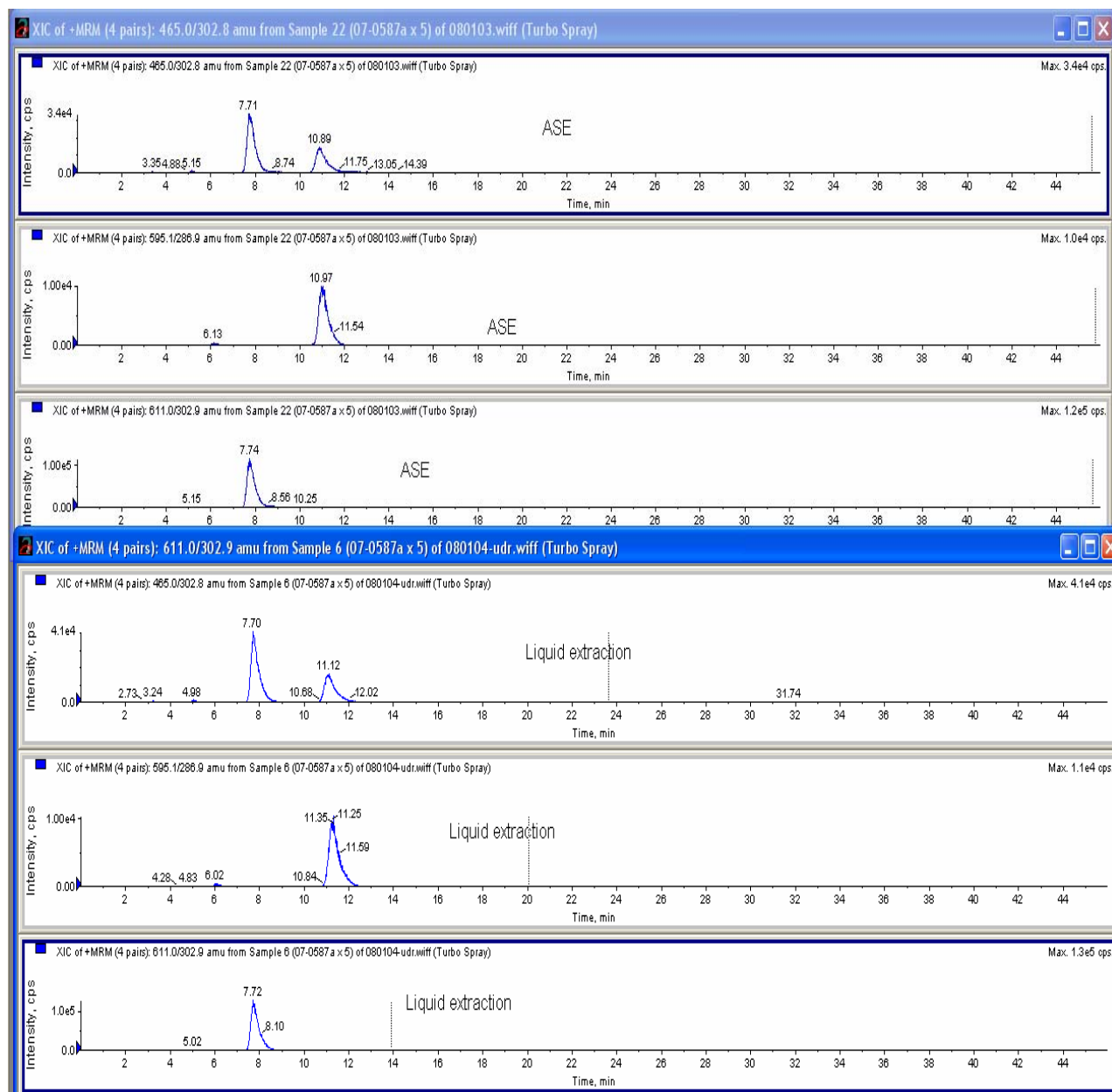


Fig 28. Cromatogramas de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo realizado a la muestra proveniente hojas verdes de plantas crecidas enmaceta grande dentro de invernadero mostrando ambos métodos de extracción. A) ASE; B) Agitación.

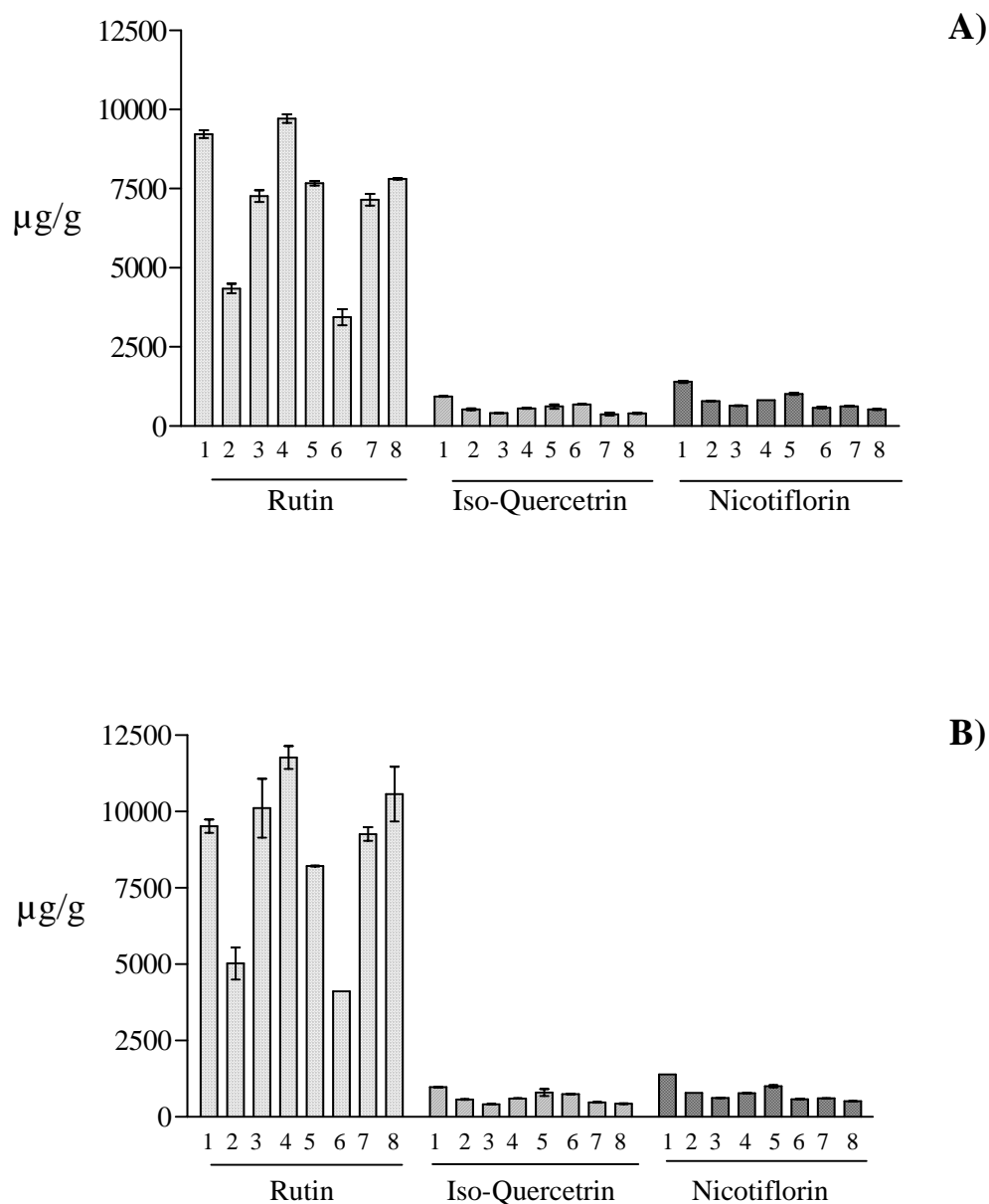


Figura 29. Producción de flavonoides en hojas de amaranto bajo diferentes condiciones de cultivo. **A)** extraídos con el método de extracción con solventes acelerada (ASE). **B)** extraídos por el método de agitación. 1. Invernadero, maceta pequeña, hoja verde 2. Invernadero, maceta grande, hojas verdes 3. Cultivadas en campos, hojas verdes 4. Cultivadas en campos, con daño por insectos, hojas verdes 5. Invernadero, maceta pequeña, hojas rojas 6. Invernadero, maceta grande, hojas rojas 7. Cultivadas en campos, hojas rojas 8. Cultivadas en campos, con daño por insectos, hojas rojas.

Basados en su tiempo de retención (RT) y patrón de fragmentación (m/z) se lograron detectar 3 flavonoides en todas las condiciones de cultivo, no obstante, fueron las plantas de hojas verdes la que presentaron en general las concentraciones más elevadas de dichos compuestos (Cuadro 4).

Cuadro 4

Contenido de flavonoides en hojas rojas y verdes de *Amaranthus hypochondriacus* cultivados en distintas condiciones.

	Flavonoides µg /g		
	rutina	iso-quercitina	nitiflorinco
Hojas verdes			
Maceta pequeña en invernadero	9236 ^a	930 ^a	1397 ^a
Maceta grande en invernadero	4343 ^e	526 ^c	785 ^c
Campo abierto	7264 ^{c, d}	407 ^d	639 ^d
Campo abierto (con daño de insectos)	9715 ^a	561 ^c	816 ^c
Hojas rojas			
Maceta pequeña en invernadero	7672 ^{b, c}	611 ^{b, c}	1014 ^b
Maceta grande en invernadero	3441 ^f	686 ^b	582 ^{d, e}
Campo abierto	7151 ^d	371 ^d	622 ^d
Campo abierto (con daño de insectos)	7807 ^b	401 ^d	523 ^e

Promedio de x repeticiones, las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas a $P \leq 0.05$

5.2.2 Rutina

La figura 16 muestra los cromatogramas de LC/MS/MS realizados a las hojas verdes (A) y rojas (B) en las diferentes condiciones de cultivo donde se identificó y cuantificó la rutina. En ambos tipos de hojas la condición de cultivo con mayor cantidad de rutina fue campo abierto con daño por insecto, en donde las hojas verdes presentaron una concentración de 9715 $\mu\text{g/g}$ y en las hojas rojas se encontraron 7807 $\mu\text{g/g}$, seguido de las plantas cultivadas en maceta chica en invernadero donde las de hojas verdes presentaron 9236 $\mu\text{g/g}$ de rutina y las hojas rojas presentaron 7672 $\mu\text{g/g}$ de este flavonoide (Cuadro 4). En las plantas cultivadas en campo abierto las concentraciones de rutina fueron de 7264 $\mu\text{g/g}$ para las hojas verdes y de 7151 $\mu\text{g/g}$ para las hojas rojas. En ambos tipos de plantas la condición de cultivo que presentó una menor producción de rutina fue la de las plantas cultivadas en maceta grande dentro de invernadero, donde las hojas verdes presentaron una concentración de 4343 $\mu\text{g/g}$ mientras que la concentración en las hojas rojas fue de 3441 $\mu\text{g/g}$. A pesar de ser las concentraciones más bajas cuantificadas en las hojas de amaranto son aproximadamente 14 veces más que las concentraciones reportadas en *Asparagus officinallis*, donde se detectaron 280 mg/kg de rutina (Makris y Rossiter, 2001).

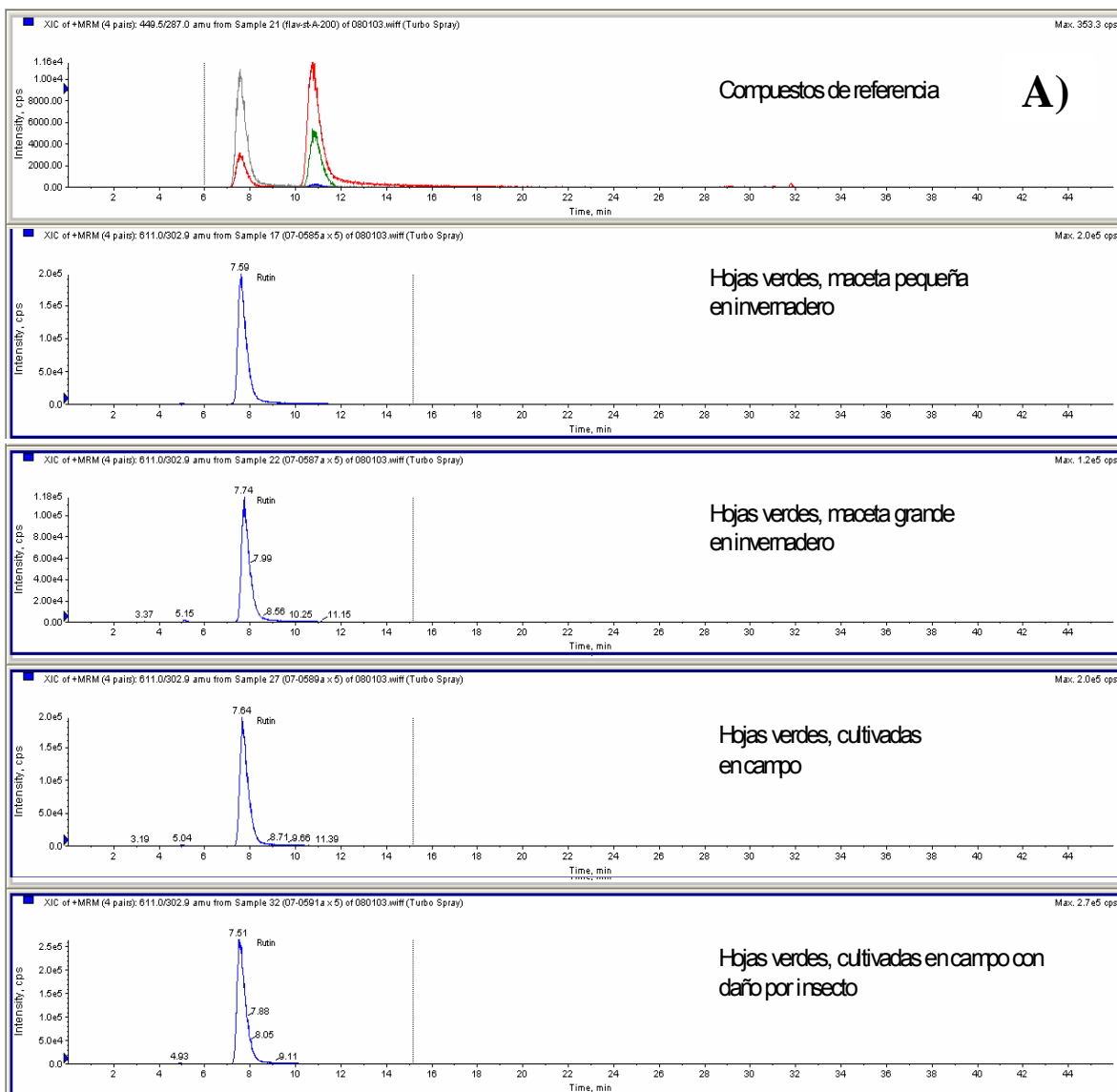


Figura 30. A) Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó la rutina, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas verdes, cultivadas en distintas condiciones.

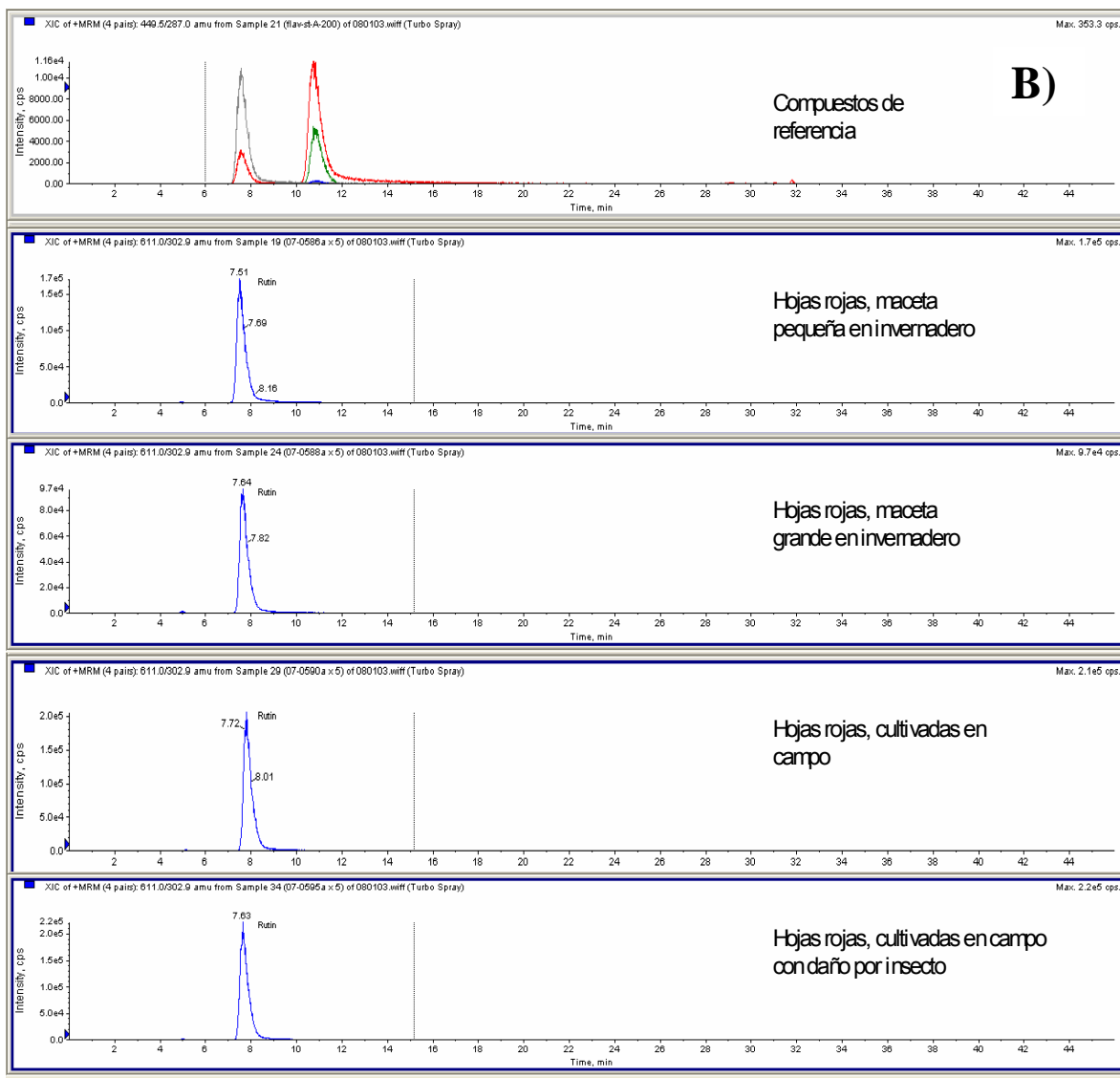


Figura 30. B) Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó la rutina, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas rojas, cultivadas en distintas condiciones.

Estos resultados muestran claras diferencias estadísticamente significativas en la producción de rutina con respecto a las condiciones de cultivo y concuerdan con experimentos comparativos previos con hojas de soya donde la rutina actúa sinérgicamente con otros glicosidos de flavonoles e isoflavones para detener el consumo y la asimilación de material vegetal por los insectos (Harborne, 2000). El estrés de nutrientes también tiene un marcado efecto en los niveles fenólicos en los tejidos vegetales, las deficiencias de nitrógeno y fósforo originan la acumulación de fenilpropanoides (Solecka, 1997). También es conocida la actividad potente antioxidante que exhibe la rutina (Ng et al, 2000), excediendo substancialmente aquellas de otros antioxidantes. Su protección es más de dos veces la fuerza antioxidativa del Trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua, que es utilizado en pruebas establecidas para determinar la potencia antioxidativa de compuestos (TEAC-test). <http://www.nutraceuticalsnow.com>.

5.2.3 Iso-quercetina

La producción de iso-quercetina en general fue mayor en las plantas crecidas dentro de invernadero que en las cultivadas en campo abierto en ambos tipos de hojas, con rangos de 526 a 930 $\mu\text{g/g}$ para las primeras y 371 a 561 $\mu\text{g/g}$ para las segundas (Cuadro 4). La figura 30 muestra los cromatogramas de LC/MS/MS realizados a las hojas verdes (A) y rojas (B) en las diferentes condiciones de cultivo donde se identificó y cuantificó la iso-quercetina. Las concentraciones más altas las presentaron las hojas verdes quienes en las muestras provenientes de plantas crecidas en maceta pequeña en invernadero tuvieron una concentración

de 930 µg/g. Una vez más existe diferencia significativa en la producción de flavonoides en cada una de las condiciones de cultivo (Cuadro 4).

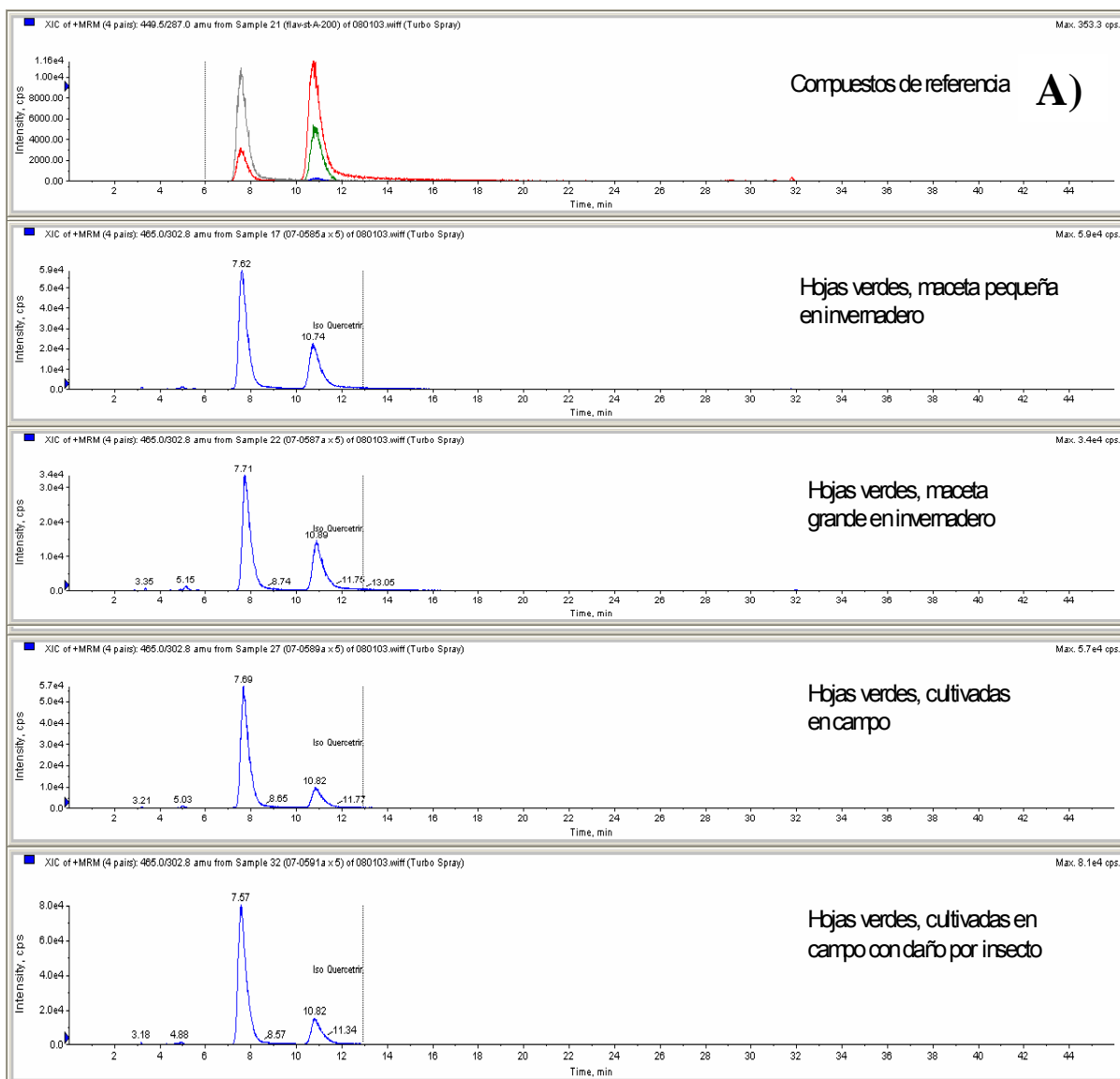


Figura 31. A) Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó la iso-quercetina, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas verdes, cultivadas en distintas condiciones.

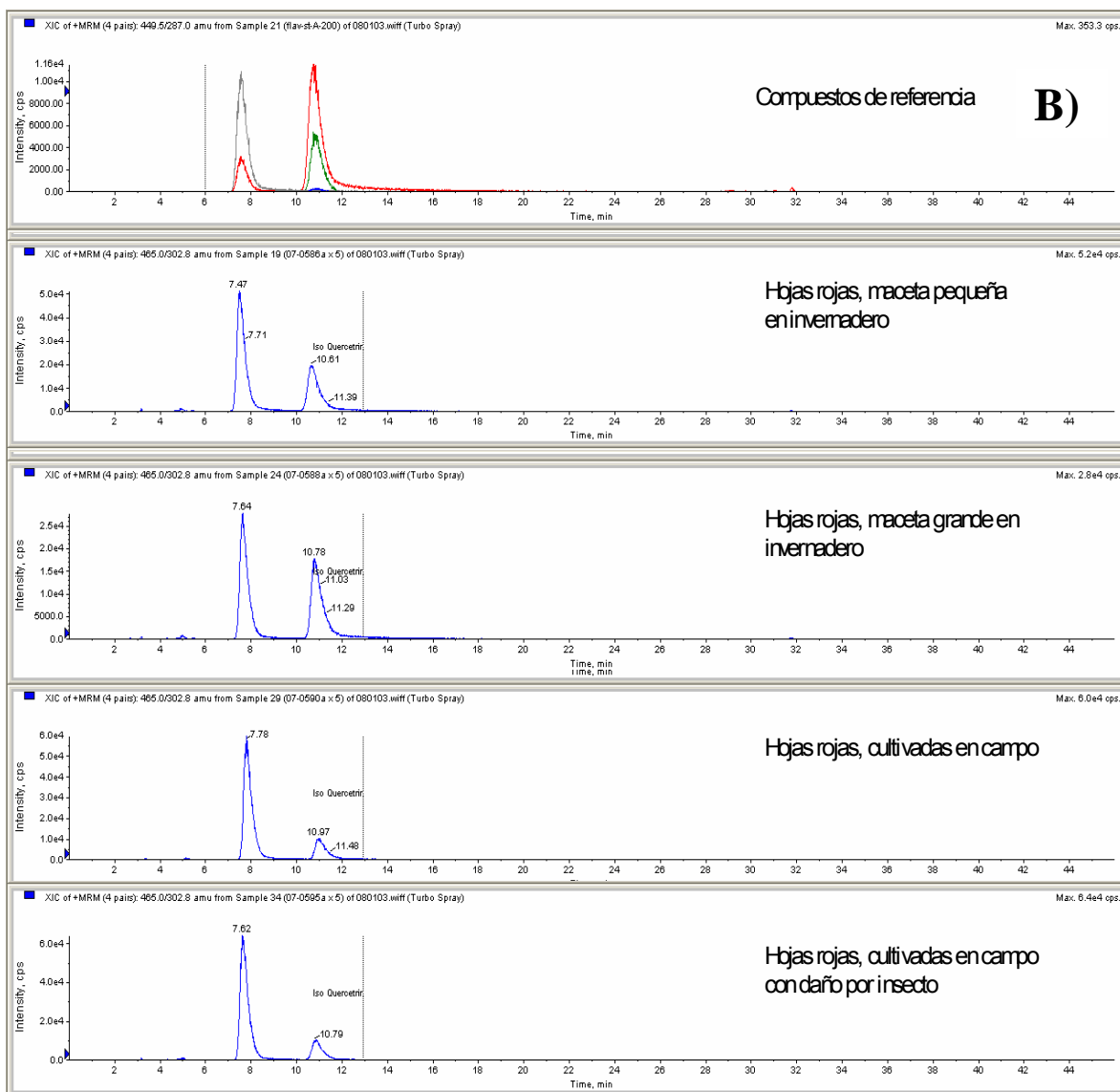


Figura 31. B) Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó la iso-quercetina, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas rojas, cultivadas en distintas condiciones.

La quercetina (el aglucón de iso-quercetina) se encuentra ampliamente distribuido en todo el reino vegetal y es el más abundante de los flavonoides. Es encontrado en muchos alimentos consumidos comúnmente como manzanas, cebollas, te, bayas y también en muchas semillas, nueces, flores y hojas. La quercetina es encontrada en plantas medicinales que incluyen *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Sambucus canadensis* y muchas otras. Es el principal componente de la actividad medicinal de éstas plantas y ha sido demostrado en numerosos estudios que ejerce variados efectos sobre el cuerpo humano. Sin embargo, no existen datos precisos acerca de su concentración en estas plantas y alimentos. Los flavonoides por regla se consideran antioxidantes y la mayoría de los efectos de la rutina se deben a su capacidad antioxidante (Thorne Research, Inc.). Se ha observado que la quercetina a concentraciones de 25 y 50 μM inhibe significativamente el crecimiento de las líneas celulares de cancer de próstata PC-3 y DU-145, también inhibe la expresión de genes que controlan las fases G_1 , S, G_2 y M del ciclo celular y recíprocamente regula la expresión de muchos genes supresores de tumores (Nair et al., 2004). Una propiedad de los flavonoides que se ha comenzado a investigar recientemente es su actividad antiviral, siendo la más notable la ejercida por ellos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el agente causante del SIDA. La quercetina parece interferir con eventos tempranos en el ciclo de vida del virus (Smirnoff N., 2005).

5.2.4 Nicotiflorin

Las mayores concentraciones de nicotiflorin se detectaron en las plantas cultivadas en maceta chica en invernadero con 1397 $\mu\text{g/g}$ en las hojas verdes y 1014 $\mu\text{g/g}$ en las hojas rojas. Las plantas cultivadas en maceta grande en invernadero presentaron concentraciones de 785 $\mu\text{g/g}$ en hojas verdes y 582 $\mu\text{g/g}$ en hojas rojas. En las plantas cultivadas en campo abierto se cuantificaron 639 $\mu\text{g/g}$ de nitiflorinco en hojas verdes y 622 $\mu\text{g/g}$ en hojas rojas.

En las plantas cultivadas en campo abierto que presentaban daño por insecto las concentraciones fueron de 816 y 523 $\mu\text{g/g}$ para las hojas verdes y rojas respectivamente. La figura 18 muestra los cromatogramas de LC/MS/MS realizados a las hojas verdes (A) y rojas (B) en las diferentes condiciones de cultivo donde se identificó y cuantificó el nicotiflorin. El nicotiflorin se ha identificado en hojas de *Camellia sinensis*, *Glycine max* (soya) y *Nicotiana tabacum*. Sin embargo no existen referencias acerca de la concentración de éste flavonoide en estas plantas (<http://www.liberherbarum.com>). Se ha comprobado que a dosis de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/g}$, nicotiflorin administrado inmediatamente después de la aparición de iskemia reduce marcadamente el volumen del infarto del cerebro (Li et al., 2006). También previos estudios han demostrado que el kaempferol (el aglucón de nicotiflorin) a concentraciones finales de 30 μM es un potente inhibidor intracelular de la muerte neuronal inducida por la lipoproteína oxidada de baja densidad (oxLDL). Por lo tanto, los flavonoides de la dieta pueden considerarse como agentes neuroprotectivos potenciales contra enfermedades neurodegenerativas (Schroeter et al., 2001).

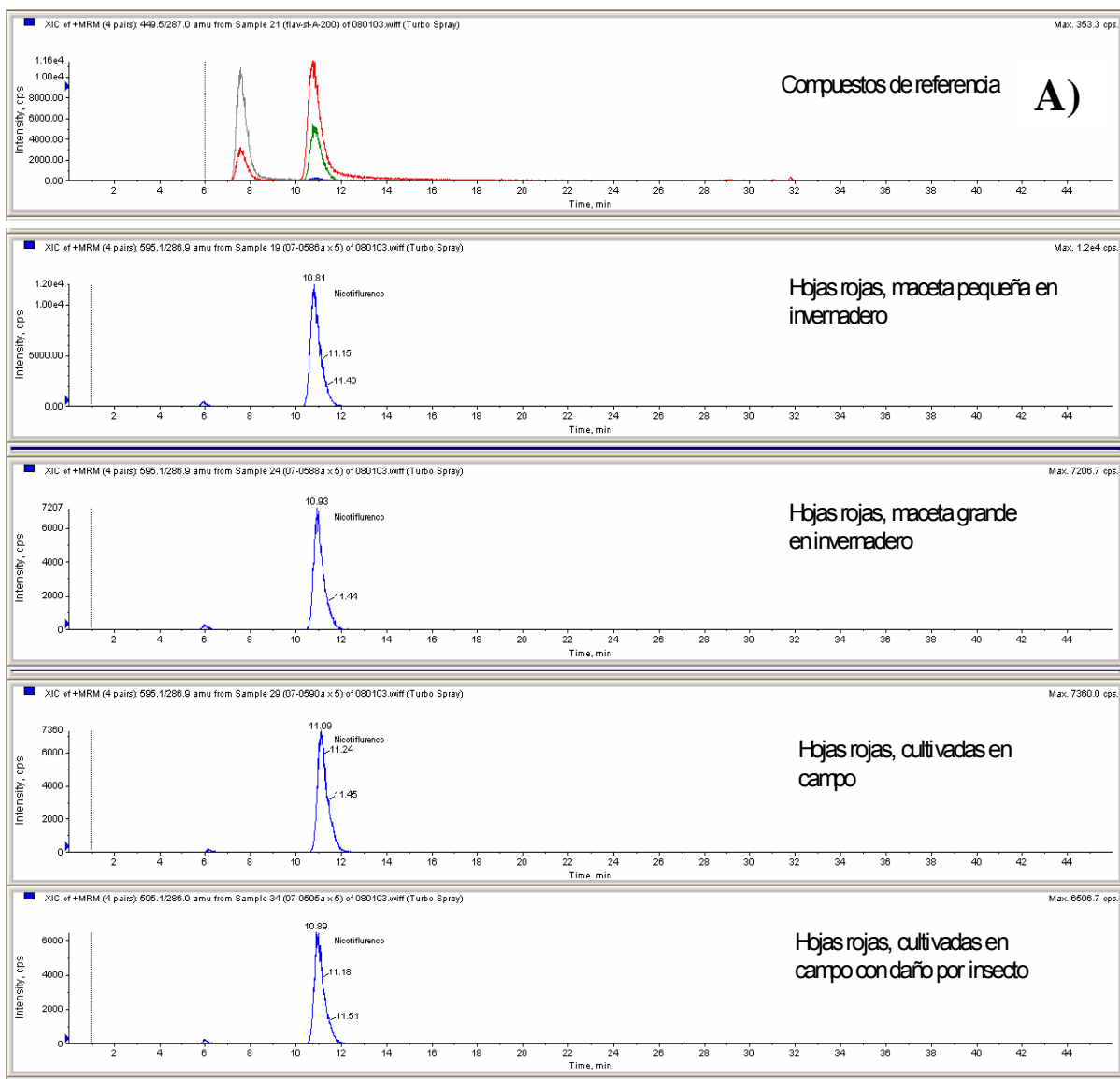


Figura 32. A) Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó el nicotiflorin, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas verdes, cultivadas en distintas condiciones.

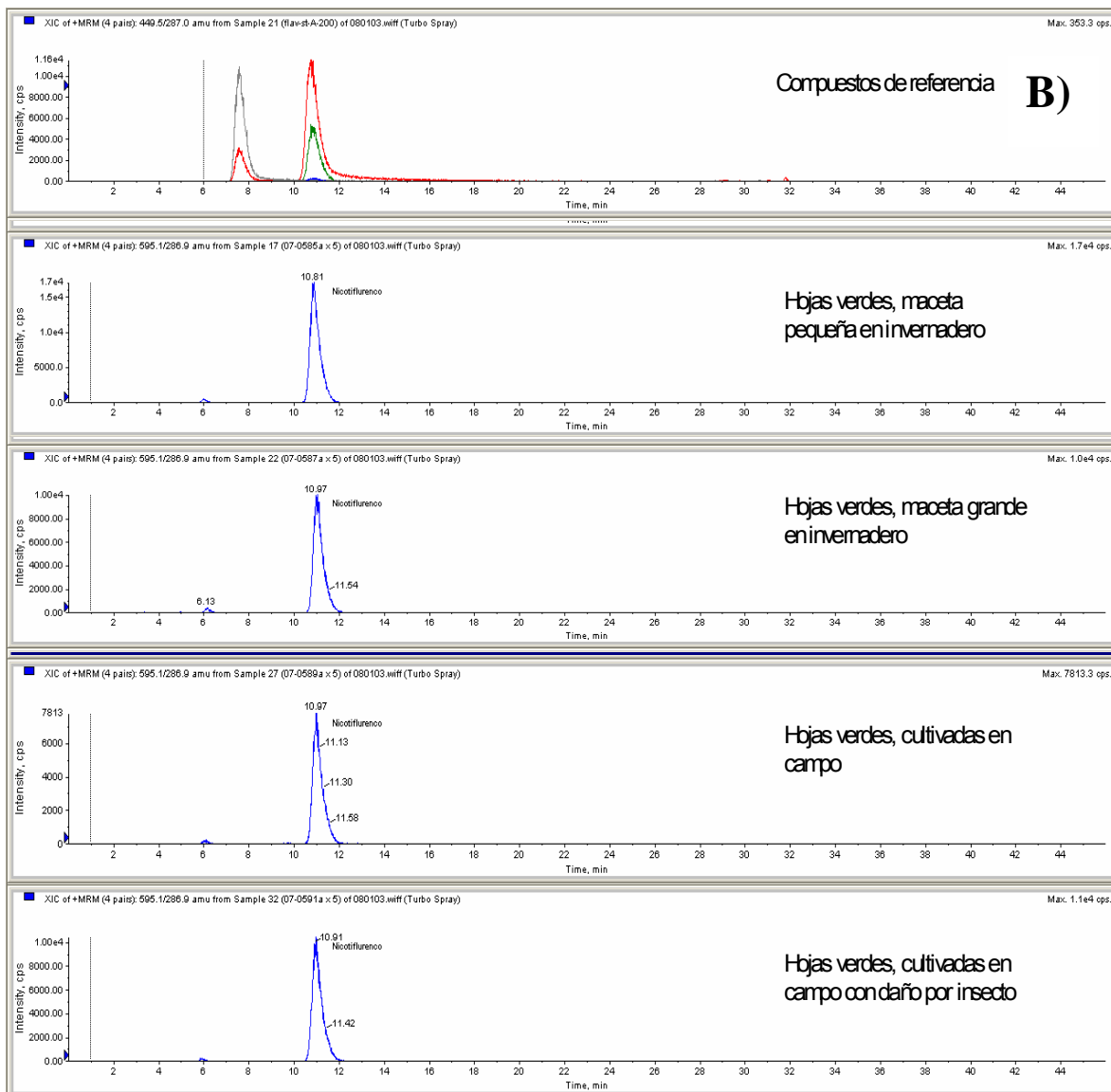


Figura 32. B) Cromatograma de HPLC/MS/MS con turbo spray multiple reaction monitoring (MRM) en modo positivo donde se detectó y cuantificó el nicotiflorin, realizado a los compuestos de referencia y a las muestras de hojas rojas, cultivadas en distintas condiciones.

La ruta de los fenilpropanoides apareció cuando las plantas colonizaron la tierra. Los primeros pasos de ésta ruta se encuentran en las briofitas. Cuando quedaron expuestas a la luz UV las plantas se vieron forzadas a desarrollar mecanismos de defensa en contra de la radiación. Se piensa que los flavonoides en un principio evolucionaron como moléculas señalizadoras y posteriormente como protectores solares (Winkel-Shirley, 2001). Conforme fueron evolucionando sus funciones diversificaron originando la amplia gama que presentan los flavonoides en la actualidad. Los resultados del presente trabajo muestran una alta producción de flavonoides en las hojas de amaranto, cuyo hábitat son climas tropicales donde se encuentra expuesto a altas temperaturas y prolongados periodos de exposición a luz UV. Las plantas que se cultivaron en maceta pequeña además presentaban un déficit de sustrato y por lo tanto de nutrientes, condición que indujo la producción de ciertos compuestos fenólicos. El ataque por insectos también provocó una diferencia en la concentración de flavonoides que se sabe son utilizados por las plantas como aleloquímicos para disuadir el herbivorismo además de evitar la asimilación del material vegetal por parte del organismo patógeno.

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo del contenido de compuestos fenólicos en hojas de *A. hypochondriacus* de las variedades Nutrisol y Criolla. Además, se analizó la influencia de las condiciones de cultivo sobre el perfil metabólico de las hojas. En general, las plantas de hojas verdes presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos que las plantas de hoja roja. Se lograron identificar cinco ácidos fenólicos: p-hidroxibenzoico, salicílico, p-cumárico, cafeico y ferúlico. El ácido salicílico solo se encontró en plantas expuestas a estrés biótico. El compuesto producido en mayores cantidades fue el flavonoide rutina, desde 3,441 hasta 9,236 $\mu\text{g/g}$, lo cual es superior al contenido de rutina reportado en otras plantas. Se identificaron dos flavonoides más, la iso-quercetina y el nicotiflorin. Las condiciones de cultivo tienen una influencia directa sobre el perfil metabólico de las hojas de amaranto. Todos estos compuestos han recibido atención por los científicos y la industria entre otras cosas por su efecto antioxidante. Los antioxidantes presentan varias actividades biológicas como propiedades antibacteriales, anti-inflamatorias y anticarcinogénicas. Debido a las propiedades antioxidantes de dichos compuestos, se han sugerido diversos efectos benéficos sobre la salud humana. Sin embargo, las bases sobre las cuales los ejercen, así como el papel que desempeñan en el metabolismo de la planta, aún no han sido establecidos completamente. La extracción, purificación y caracterización de antioxidantes a partir de plantas puede contribuir en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de varios desordenes de la salud o en

la prevención de ciertas enfermedades. Los antioxidantes pueden ser utilizados en la fórmula de productos alimenticios con propiedades nutricionales y organolépticas deseables.

VII. Referencias

- Baxter C.J., Redestig H., Schauer N., Repsilber D., Patil K.R., Nielsen J. Selbig J., Liu J., Fernie A.R., Sweetlove L.J. The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant Physiology* 143: 312-325, 2007.
- Birosová L, Mikulášová M, and Vaverková S. Antimutagenic effect of phenolic acids. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 149 (2):489- 491, 2005.
- Brosche M., Vinocur B., Alatalo E.R., Lamminmaki A., Teichmann T., Ottow E.A., Djilianov D., Afif D., Bogeat-Triboulot M.B., Altman A., Polle A., Dreyer E., Rudd S., Paulin L., Auvinen P., Kangasjarvi J. Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biol* 6: R101, 2005.
- Carr A.C., Zhu B.Z. y Frei B. Potencial anti-arterogénico mecanismo de ascorbate (vitamin C) and alpha- tocopherol (vitamin E). *Circulation Research* 87, 349-354, 2000.
- Chitindingu K., Ndhala A.R., Chapano C., Benhura M.A. and Muchuweti M. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (Pigweed), *Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum*. *Journal of Food Biochemistry* 31 (2007) 206-216.
- Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow M.F. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 15243-15248, 2004.
- Cramer G.R., Erguá A., Tillett R.L., Tattersall E.A., Bohlman M.C., Vincent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D., Achlauch K.A., Schooley D.A., Cushman J.C. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics* 7: 111-134, 2007.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. En *Plant Secondary Metabolites, Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. (Ed. Crozier A., Clifford M.N. y Ashihara H.) Blackwell Publishing. pp. 1-24, 2006.
- DeFelice SL, *Nutraceuticals: Opportunities in an Emerging Market*, Scrip Mag 9. 1992.
- Dengler N.G. y Nelson T. Leaf structure y development in C₄ plants. En *Sage y Monson (eds.), C₄ Plant Biology*. Academic Press, pp. 133-172, 1999.

- Dey G., Chakraborty M., Mitra A. Profiling C₆-C₃ and C₆-C₁ metabolites in *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology* 162, 375-381, 2005.
- Dillard CJ, German JB, Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1744-1756, 2000.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB & Roberfroid MB. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition* 81(Suppl. 1), S1-S27, 1999.
- Donovan J.L., Manach C., Faulks R.M. y Kroon P.A. Absorption and Metabolism of Dietary Plant Secondary Metabolites. En *Plant Secondary Metabolites, Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. (Ed. Crozier A., Clifford M.N. y Ashihara H.) Blackwell Publishing. pp. 303-351, 2006.
- Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427-5440, 2002.
- Ferguson L.R., Zhu S.T., and Harris P.J. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 49 (6):585-593, 2005.
- Fiehn O., Wohlgemuth G., Scholz M., Kind T., Lee D.Y., Lu Y., Moon S. y Nikolau B. Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *The Plant Journal* 53, 691-704, 2008.
- Griffin JL. Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 857-871, 2004).
- Gong Q., Li P., Ma S., Indu Rupassara S., Bohnert H.J. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 44: 826-839, 2005.
- Hall RD. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New phytologist* 169: 453-468, 2006.
- Harborne J. B. and Williams C.A. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* 55:481-04, 2000.
- Henson S, Masakure O, Cranfield J. The propensity for consumers to offset health risks through the use of functional foods and nutraceuticals: The case of lycopene. *Food Quality and Preference* 19: 95-406, 2008.

- Herath D, Cranfield JL & Henson S. Health claims as credence attributes: Evidence from functional foods and nutraceutical sector in Canada. International Food Economy Group Working Paper No. 2, Department of Food, Agricultural and Resource Economics, University of Guelph, Canada, 2007.
- Hernandez G., Ramirez M., Valdez-Lopez O., Tesfaye M., Graham M.A., Czechowski T., Schlereth A., Wandrey M., Erban A., Cheung F., Wu H.C., Lara M., Town C.D., Kopka J., Udvardi M.K., Vance C.P. Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol* 144: 752-767, 2007.
- Hopkins, W.G. Capítulo 14. Moléculas y Metabolismo en *Introduction to Plant Physiology*. 2nd ed. New York: J.Wiley. pp. 267-284 1999
- Jansen P.L., Hollman P.C., Venema D.P. et al. Salicylates in foods. *Nutr Rev* 54, 357-359. Jong Suk L., Dong Hyun K., Kwang-Hyeon L., Tae Kwang O. and Choong Hwan L. Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; 19: 3539-3548, 2005
- Kanai R. y Edwards G.E. The biochemistry of C₄ fotosynthesis. En Sage y Monson (eds.), *C₄ Plant Biology*. Academic Press, pp. 49-87, 1999.
- Kelly G.S. Squalene and its potential clinical uses. *Altern Med Rev* 4(1): 29-36, 1999.
- Klimczack I, Malecka M., and Pacholek B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Nahrung/Food* 46 number 3:184-186, 2002.
- Kuenzing W., Chau J., Norkus E., Holowaschenko H., Newmark H., Mergens W. y Conney A.H. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* 5:309-313, 1984.
- Kwak NS & Jukes DJ. Functional foods Part 1: The development of a regulatory concept, food control. *Food Quality and Preference* 12: 99-107, 2001.
- Le Lay P., Isaura M.P., Sarry J.E., Kuhn L., Fayard B., Le Bail J.L., Bastien O., Garin J., Roby C., Bourguignon J. Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie* 88: 1533-1547, 2006.
- Lee W.J. y Zhu B.T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* Vol. 27 no. 2, 269- 277, 2006.

- Li R.P., Guo M.L., Zhang G., Xu X.F., and Li Q. Neuroprotection of nicotiflorin in permanent focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29 (9):1868-1872, 2006.
- Lin J.K. y Weng M.S. Flavonoids as nutraceuticals. En *The Science of Flavonoids*. (Ed. Erich Grotewold) pp. 213-238. Springer Science+ Business Media, Inc. 2006.
- Martirosyan D.M., Miroshnichenko L.A., Kulakova S.N., Pogojeva A.V., and Zolodov V.I. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids in Health and Disease* 6 (1), 2007.
- McIntyre R.J. y Vaughan P.F.T. Kinetic studies on the hydroxylation of p-coumaric acid to caffeic acid by Spinach-Beet phenolase. *Biochem J* 149, 447-461, 1975.
- Meier U. (Ed). Growth stages of mono and dicotyledonous plants. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. BBCH Monograph 2nd edition, 2001.
- Memelik J. Tailoring the plant metabolome without a loose stitch. *Trends in Plant science* 7: 305-307, 2004.
- Nair R.B., Bastress K.L., Rueger M.O., Denault J.W., and Chaple C. The *Arabidopsis thaliana* reduced epidermal fluorescence1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* 16:544-554, 2004.
- Ng T.B., Liu F., and Wang Z.T. Antioxidant activity of natural products from plants. *Life Sciences* 66 (8):709- 723, 2000.
- Nikiforova V.J., Gakiere B., Kempa S., Adamik M., Willmitzer L., Hesse H., Hoefgen R. Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *J Exp Bot* 55: 1861-1870, 2004.
- Oksman-Caldentey K-M, Inze D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9: 433-440, 2004.
- Olajide, O.A., Ogunleye, B.R., Erinle, T.O., Anti-inflammatory properties of *Amaranthus spinosus* leaf extract. *Pharmaceutical Biology* 42: 521-524, 2004.
- Oliver S.G. From DNA sequence to biological function: the new voyage of the Beagle. *Biochem. Soc. Trans* 24, 291-292, 1996.
- Paredes Lopez O. and Valverde M.E. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamerica le ha dado al mundo. *Cinvestav julio-septiembre*:65-73,

2006. Paredes- López O. Amaranth: biology, chemistry and technology. CRC Press, Inc. 1994.
- Riley R.G. y Kolattukudy P.E. Evidence for covalently attached p-coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiology* 56, 650-654, 1975.
- Russo G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochemical Pharmacology* 74: 533-544, 2007.
- Rogers L.A., Dubos C., Surman C., Willmet J., Cullis I.F., Mansfield S.D., and Campbell M.M. Comparison of lignin disposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytologist* 168:123-140, 2005.
- Schroeter H., Spencer J.P.E., Rice-Evans C., and Williams R.J. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase 3. *Biochemical Journal* 358:547-557, 2001.
- Schwager J, Mohajeri MH, Fowler A, Weber P. Challenges in discovering bioactives for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology* 19:66-72, 2008.
- Segura-Nieto M, Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. Biochemistry of Amaranth Proteins. En *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*. (ed. Paredes-López O.). CRC Press Inc. pp. 75-106, 1994.
- Shulaev V., Cortes D., Millar G. y Mittler R. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*. 132: 199-208, 2008.
- Silva-Sanchez C., Barba de la Rosa A.P., León-Galvan M.F., De Lumen B.O., De León- Rodríguez A. y Gonzales de Mejía E. Bioactive peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J. Agric Food Chem* 56: 1233-1240, 2008.
- Smirnoff N. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. (Ed. Smirnoff N.) Blackwell Publishing, 2005.
- Strack D. Phenolic metabolism. In *Plants Biochemistry* (Dey P.M. y Harbone J.B., eds.). Academic Press, San Diego. pp. 387-416, 1997.
- Strobel P., Allard C., Perez-Acle T., Calderon R., Aldunate R., and Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adiposits. *Biochemical Journal* 386:471-478, 2008.
- Srinivasan M., Sudheer A.R., and Menon V.P. Ferulic Acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition* 40:92-100, 2007.

- Solecka D. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 (3):257-268, 1997.
- Suryavanshi, V.L., Sathe, P.A., Baing M.M., Singh, G.R. Lakshim, S.N. Determination of rutin in *Amaranthus spinosus* Linn. Whole plant powder by HPTLC. *Chromatographia* 65: 767-769, 2007.
- Svirskis, A. Investigation of amaranth cultivation and utilisation in Lithuania. *Agronomy Research* 1: 253-264. 2003
- Thorne Research, Inc. *Alternative Medicine Review* vol. 3, No.2: 140-143, 1998.
- Valdes-Rodriguez S., Segura-Nieto M., Chagolla-Lopez A., Verver y Vargas-Cortina A., Martinez-Gallardo N. and Blanco-Labra A. Purification, characterization, and complete aminoacid sequence of a trypsin inhibitor from *Amaranth (Amaranthus hypochondriacus)* seeds. *Plant Physiology* 103: 1407-1412, 1993.
- Valkova N., Lépine F., Valeanu L., Dupont M., Labrie L., Bisailon JG., Beudet R., Sharek F. y Villemur R. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic acid esters (Parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and Environmental Microbiology* 2404-2409, 2001.
- Venema D.P., Hollman P.C.H., Janssen K.P.T.L.M. et al. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods using HPLC with fluorescence detection. *J Agr Food Chem* 44, 1762-1767, 1996.
- Verbeke W. Consumer acceptance of functional foods: Sociodemographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference* 16: 45-57, 2005.
- Verbeke W. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health. *Food Quality and Preference* 17: 126-131, 2006.
- Verhagen B.W.M., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. Induced disease resistance signaling in plants. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume III*, Global Science books, 2006.
- Vermerris W. y Nicholson R. Chapter 3. Biosynthesis of Phenolic Compounds. En *Phenolic compounds Biochemistry*. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. pp. 63-150, 2006.
- Yong-Woog L., Shouguang J., Woong-Seop S., y Nester E.W. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:12245-12249. 1995.

Yongqing Ma. Allelopathic studies of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Weed Biology and Management* 5, 93-104, 2005.

7.1 Referencias web

El portal del Amaranto. <http://www.amaranto.org.mx>

European Nutrigenomics Information Portal. <http://www.nugo.org/>

Liber Herbarum. <http://www.liberherbarum.com>

Metabolomics Australia. <http://www.metabolomics.net.au>

Organización Farmacéutica Colegial. <http://www.portalfarma.com>

Phytochemicals. <http://www.phytochemicals.info>

Plant Metabolomics Centre of Excellence.
<http://www.plantenergy.uwa.edu.au/metabolomics/>

The university of Melbourne. http://uninews.unimelb.edu.au/articleid_4037.html

United States National Library of Medicine. <http://www.nlm.nih.gov>

Universidad de Hamburgo. Departamento de Biología.
<http://www.biologie.uni-hamburg.de/>

VIII. PERSPECTIVAS

- Colectar el tamaño de todas las señales de mediciones realizadas en espectrómetros de masas o UV
- Comparar las señales entre distintas variedades
- Aislar, purificar e identificar los compuestos
- Realizar todos los estudios mencionados en diferentes estadios de desarrollo del amaranto