



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Nutrición

Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante y factores antinutricios en hojas y granos de Amarantho (*Amaranthus hypochondriacus L*) cultivado bajo ambiente protegido y a campo abierto

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Nutrición

Presenta:

Mariana Fuentes Reyes

Dirigido por:

Dr. Jorge Luis Chávez Servín

SINODALES

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Presidente

Firma

Dra. Karina de la Torre Carbot
Secretario

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Vocal

Firma

Dra. Olga Patricia García Obregón

Suplente

Firma

Dr. Roberto Ferriz Martínez

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo de 2014
México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Resumen

La hoja y el grano de amaranto poseen características nutrimentales muy importantes, como lo es su contenido de compuestos antioxidantes que cubren una amplia gama de actividades metabólicas y tienen diferentes funciones en el organismo que recaen en la prevención o tratamiento de varias enfermedades.

El estudio tuvo como objetivo determinar y comparar la cantidad de compuestos fenólicos totales y otros antioxidantes, la capacidad antioxidante y el contenido de algunos factores antinutricios, en muestras de hoja y grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de la variedad Revancha provenientes de dos métodos de cultivo, ambiente protegido y campo abierto. Las determinaciones en hoja de amaranto se llevaron a cabo con muestras tomadas del cultivo después del 1, 2 y 3er mes de la siembra, en grano de amaranto se llevaron a cabo con las muestras de la cosecha. Los análisis realizados comprendieron la determinación del contenido de ácido fítico, actividad inhibitoria de tripsina, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos totales, antocianinas totales y taninos condensados. Se compararon estas variables contra el método de cultivo (ambiente protegido vs campo abierto). Se observó que el Ácido Fítico y la Actividad Inhibitoria de Tripsina no sufren variaciones a lo largo del tiempo en ambos métodos de cultivo, pero se observan valores mayores en las muestras de hoja del cultivo a campo abierto. Se observa que se tienen mejores resultados de la Capacidad Antioxidante en las hojas y granos de *Amaranthus hypochondriacus* cuando la planta se cultiva en campo abierto, al igual que los Compuestos Fenólicos Totales y los Taninos Condensados. Se observó que tanto la Capacidad Antioxidante así como la producción de compuestos antioxidantes fue mayor en los cultivos en campo abierto. Si bien es cierto que el cultivo en invernadero ofrece numerosas ventajas desde el punto de vista del ambiente térmico, del rendimiento y de las condiciones de confort para la planta, esto resultó en una desventaja frente a los cultivos a campo abierto. Lo anterior origina la búsqueda de elicitores que puedan ser aplicados dentro del invernadero con el objetivo de promover la producción de antioxidantes, como compuestos secundarios de las plantas.

Palabras clave: amaranto, hoja, grano, ambiente protegido, campo abierto.

Summary

Leaf and grain amaranth have important nutritional characteristics, as is its content of antioxidant compounds that cover a wide range of metabolic activities and have different functions in the body that fall in the prevention or treatment of various diseases. This study aimed to determine and to compare the amount of total phenolic compounds and other antioxidants, the antioxidant capacity and some anti-nutritional factors content in leaf samples and grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Revancha variety from two culture methods: protected environment and open field. Determinations in leaf amaranth were carried out on samples after 1, 2 and 3rd month of planting. In grain amaranth were carried out with samples of the crop. Analyses were performed to determine the phytic acid content, trypsin inhibitory activity, antioxidant activity, total phenolics, condensed tannins and anthocyanins. These variables were compared with the culture method (protected environment vs. open field.) We note that the phytic acid and trypsin inhibitory activity do not undergo changes over time in both culture methods, but higher values were observed in leaf samples from open field cultivation. Best Antioxidant Capacity results were observed in leaves and grain Amaranth in the plant grown in open field, similar to the Total Phenolic Compounds and Condensed Tannins. It was observed that both the Antioxidant Capacity and the production of antioxidant compounds were higher in open field crops. While it is true that greenhouse cultivation offers numerous advantages from the point of view of the thermal environment, performance and comfort conditions for the plant, this resulted in a disadvantage compared to open field crops. This causes the search for elicitors that can be applied in the greenhouse in order to promote the production of antioxidants, such as secondary plant metabolites.

Keywords: amaranth leaf, grain, protected environment, open field.

Dedicatória

Agradecimientos

INDICE

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
I N D I C E.....	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras.....	viii
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Historia del Amaranto.....	3
2.2 Características Generales del Amaranto	7
2.3 Importancia del Amaranto en México	12
2.4 Importancia del estudio del Amaranto	13
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
IV HIPÓTESIS	16
V OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivosespecíficos	16
VI MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Sitio experimental.....	17
6.2 Establecimiento del cultivo	17
6.3 Monitoreo de temperatura y humedad.....	18
6.4 Selección de la muestra	19
6.5 Determinaciones analíticas	19
6.5.1 Determinación del contenido de Ácido Fítico.....	19
6.5.2 Determinación de Actividad Inhibitoria de Tripsina	20
6.5.3 Determinación Capacidad Antioxidante (AntioxidanAssay Kit)	21
6.5.4 Determinación de Capacidad Antioxidante por el Método FRAP	23
6.5.5 Determinación de Capacidad Antioxidante por el Método DPPH.....	24
6.5.6 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales.....	24
6.5.7Determinación de Antocianinas Totales	25
6.5.8Determinación de Taninos Condensados	26
6.6 Análisis Estadístico	26

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Ácido Fítico	28
7.2 Actividad Inhibitoria de Tripsina.....	29
7.3 Capacidad Antioxidante	31
7.3.1 Antioxidant Assay Kit.....	31
7.3.2 FRAP	32
7.3.3 DPPH.....	32
7.4 Compuestos Fenólicos Totales	34
7.5 Antocianinas Totales.....	35
7.6 Taninos Condensados	37
VIII CONCLUSIONES.....	40
IX REFERENCIAS	42
ANEXOS.....	46

Índice de tablas

Tabla 1 Contenido de Ácido Fítico en muestras de grano y hoja de amaranto.....	28
Tabla 2 Contenido de Tripsina Pura Inhibida en muestras de grano y hoja de amaranto.....	29
Tabla 3 Capacidad Antioxidante por medio de un Antioxidant Assay Kit.....	31
Tabla 4 Capacidad Antioxidante por el método FRAP en muestras de grano y hoja de amaranto.....	32
Tabla 5 Capacidad Antioxidante por el método DPPH en muestras de grano y hoja de amaranto.....	32
Tabla 6 Contenido de Compuestos Fenólicos Totales en muestras de grano y hoja de amaranto.....	34
Tabla 7 Contenido de Antocianinas Totales en muestras de grano y hoja de amaranto.....	35
Tabla 8 Contenido de Taninos en muestras de grano y hoja de amaranto.....	37

Índice de figuras

Figura 1 Imágenes del grano de amaranto en un microscopio de barrido..	9
Figura 2. Imágenes de la planta de amaranto en el cultivo de ambiente protegido	11
Figura 3 Fotos del ensayo de DPPH en muestras de amaranto molido.	63

ANEXOS

ANEXO 1. Ácido Fítico.....	46
ANEXO 2. Actividad Inhibitoria de Tripsina	49
ANEXO 3. Antioxidant Assay Kit	52
ANEXO 4. FRAP	56
ANEXO 5. DPPH	59
ANEXO 6. Compuestos Fenólicos	64
ANEXO 7. Antocianinas Totales.....	70
ANEXO 8. Taninos Condensados	74

I INTRODUCCION

La combinación de numerosos climas, la diversidad florística nativa y la presencia de grupos humanos desde hace más de 30 000 años, han favorecido la evolución de las plantas, el endemismo y la domesticación de varias especies vegetales en México. Esta diversidad florística nativa permitió el florecimiento de las culturas prehispánicas, mismas que a la llegada de los españoles cultivaban y utilizaban un gran número de especies como maíz, frijol, chile, calabaza, amaranto, cacao, etcétera (Molina and Cordoba, 2006).

Mesoamérica ha sido el origen y centro de la diversidad genética de algunos de los cultivos alimentarios más importantes para la humanidad. Basta con mencionar el maíz, el frijol, el tomate, el chile, el aguacate, la calabaza, el cacao, la vainilla, diferentes cactáceas, hongos comestibles y el amaranto (o amarantos, pues se trata de un conjunto de plantas, aunque por costumbre se les agrupa bajo el nombre en singular), tan sólo como muestra de la riqueza alimentaria que nuestra región ha aportado al mundo (Morales et al., 2009).

Existen tres especies del género *Amaranthus* que producen grandes inflorescencias repletas de semillas comestibles y que han sido domesticadas independientemente de las especies arbustivas: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, que se cultiva en México y Guatemala, respectivamente, y *A. caudatus*, que se cultiva en Perú (Morales et al., 2009).

El amaranto fue domesticado en América hace más de 4000 años por las culturas prehispánicas. Fue cultivado en el valle de la ciudad de México, así como el maíz, frijol y calabazas, también fue cultivado por los mayas en Guatemala y por los Incas en Sudamérica (Mujica-Sánchez and Berti, 1997). Cuando los españoles llegaron a América, el amaranto o *huautli* era uno de los granos más apreciados por los aztecas. Se estima que ellos producían de 15 a 20 000 toneladas por año y, además formaba parte de los tributos que cobraban a los pueblos sometidos. Con la llegada de los europeos a América se inició un intenso intercambio de cultivos en el que algunos de éstos cobraron mayor importancia mientras que otros llegaron casi a desaparecer (Becerra, 2000). El amaranto se encuentra en zonas templadas,

tropicales y subtropicales del planeta. Se adaptan a casi cualquier circunstancia; desde los ambientes secos, con apenas trescientos milímetros de lluvia al año, hasta los muy húmedos con más de dos mil milímetros; desde regiones al nivel del mar hasta zonas elevadas a tres mil metros; en suelos de alta, mediana e incluso de baja calidad (SAGARPA, 2014).

Una de las características más importantes del amaranto es, sin duda, su alto valor nutrimental. Los amarantos, además, se pueden aprovechar de múltiples formas, como grano, como verdura o como forraje. Es también un cultivo altamente eficiente que puede prosperar en condiciones agroclimáticas adversas, tales como sequía, altas temperaturas y suelos salinos. La semilla presenta una gran versatilidad, pudiéndose utilizar en la preparación de diversos alimentos y tiene, además, un potencial prometedor en aplicaciones industriales, tanto en la industria de los alimentos como en la elaboración de cosméticos, colorantes y hasta plásticos biodegradables (Becerra, 2000).

El interés por su amplio consumo en la alimentación humana ha crecido en las últimas dos décadas debido a los informes favorables del valor nutritivo del amaranto y beneficios para la salud. Una de las líneas de investigación sobre el amaranto, es la variación en la composición nutrimental relacionado con su forma de cultivo (Millán et al., 2012). Esta investigación se llevó a cabo para aportar información que permita conocer el valor nutritivo del amaranto proveniente de dos diferentes medios de crecimiento, con el fin de sustentar científicamente la comparación de la composición nutrimental de la planta de amaranto cultivado bajo dos métodos de cultivo, invernadero y campo abierto.

II ANTECEDENTES

2.1 Historia del Amaranto

El amaranto fue una planta muy apreciada en los pueblos precolombinos, el desconocimiento de los conquistadores provocó su agonía. En la actualidad, el aporte particular y científico trata de restituirle su lugar como recurso nutricional y económico (Trujillo, 1988).

Existen hallazgos arqueológicos que indican que el grano de amaranto fue uno de los alimentos más importantes en el México prehispánico; probablemente los primeros en utilizarlo como un cultivo altamente productivo fueron los mayas, de quienes otros pueblos de América, entre ellos los aztecas y los incas aprendieron su consumo (Becerra, 2000). Fue uno de los alimentos básicos de América, casi tan importante como lo eran el maíz y el frijol en el Valle de México o la papa, el maíz y la quinua en Sudamérica. Por su relevancia en la dieta de los antiguos mexicanos, el amaranto tuvo una considerable importancia económica (Morales et al., 2009).

La palabra “amaranto” deriva del griego: “a”, negación y “maraíno”, marchitarse, con lo que se alude a la resistencia de esta planta a la sequía. De allí a que se diga que la palabra amaranto significa “inmortal” (Morales et al., 2009). Antes de la llegada de los españoles, los indígenas sólo utilizaban el huautli (amaranto en náhuatl) reventado. El nombre “alegría” se le adjudicó en el siglo XVI al dulce que se fabrica con la semilla reventada y luego, por extensión, a la planta entera. A Fray Martín de Valencia (1473-1534) se le ocurrió mezclarlo con miel. Cuentan los relatos de la época que los indígenas probaron el dulce resultante y les pareció tan sabroso que empezaron a bailar y a cantar de alegría. De ahí, dice la leyenda, surgió el nombre de este dulce (Morales et al., 2009).

Actualmente, la forma más común de consumir el amaranto en México es en el popular dulce “alegría”, con la diferencia de que en lugar de harina de amaranto se utilizan las semillas reventadas. En menor escala, y de manera más localizada, las semillas son molidas y mezcladas con maíz para la preparación de tamales, atoles y pinole (Becerra, 2000).

Los antiguos mexicanos tenían una alimentación cotidiana sencilla pero balanceada, compuesta básicamente de tortillas de maíz, atole de amaranto o de chíá, tamales de maíz y de amaranto, y frijoles (Hernández and Herrerías, 1998).

Además de las semillas, la planta tierna se consumía como verdura; los tallos y las hojas verdes, ya maduros, se comían cocidos con sal. Diversos estudios realizados por Mapes *et al.* (1997), demuestran que, en la actualidad, el consumo de “quintoniles” (nombre que se da a las hojas comestibles del amaranto) es muy alto entre la población campesina de algunas regiones del centro del país y forma parte importante de su dieta (Becerra, 2000).

El amaranto ocupó un sitio privilegiado en las fiestas ceremoniales prehispánicas, pues se hallaba íntimamente vinculado a los ritos religiosos y se sembraba como protección contra los espíritus malignos. Debido al color sangre con el que está matizada la planta de amaranto, ésta se consideró como una planta mística unida a la leyenda y al rito. En esa época era común que se hicieran con el huautli figuras de dioses, así como “la figura de Huitziopochtli, Panquetzaliztli y Tlacaxipehualiztli, la del dios del fuego; las de Xocotl, Huetzi y Tláloc, dioses acuáticos de las montañas, con los dientes con pepitas de calabaza y los ojos con frijoles llamados ayocotli” (Velasco and Heyden, 1986).

Algunos grupos indígenas sembraban los amarantos como fuente de pigmento para colorear las “hostias” ceremoniales de pan de maíz; las mujeres usaban las semillas para elaborar el zoale, alimento que se ofrecía al dios del fuego en el mes de enero y para celebrar el rito Teoqualo (comer al dios). Para ello trituraban la semilla y la mezclaban con miel o sangre humana; a esta masa teñida de rojo le daban forma de serpientes, aves, montañas o perros que personificaban a sus dioses; después distribuían estas figuritas entre las personas, a manera de comunión en sus danzas tradicionales y las comían en los templos durante las ceremonias de ofrendas humanas (Jurado Renteria, 1998).

Por su importancia en la alimentación y en la vida cotidiana de nuestros antepasados, el amaranto o huautli se relacionó con leyendas, rituales y sacrificios humanos que se ofrecían a dioses como Xiotecutli, también llamado Huehuetéotl, dios antiguo o dios del fuego (Curiel, 1994). Cuando los aztecas efectuaban el

principal festival del año, dedicado a Huitzilopochtli (dios de la guerra), el centro de la ceremonia consistía en un enorme ídolo del dios confeccionado con masa de huautli, miel y sangre humana, que se paseaba por la ciudad y los suburbios en una tarima; al final, era despedazado y comido por la gente con “reverencia, temor y lágrimas”, como indicara José de Acosta en su “Historia natural y moral de las indias”. Los españoles asociaban este hecho con la ceremonia de la eucaristía del cristianismo y, como muchas otras costumbres, el consumo de figuras de tzoalli se prohibió y se persiguió a quienes lo hacían. El huautli era la planta ceremonial más importante de los aztecas y otros pueblos de México (Morales et al., 2009).

Existen autores que señalan que con la finalidad de erradicar estas prácticas, consideradas el equivalente pagano del sacramento de la comunión cristiana, los conquistadores prohibieron la siembra del amaranto, imponiendo fuertes castigos a quien lo cultivara y a quien simplemente lo poseyera, razón por la que casi desapareció de Mesoamérica, conservándose solamente en unas cuantas regiones. De esta manera, el celo religioso de los conquistadores, que buscaba erradicar prácticas religiosas paganas, destruyó el balance de la dieta de los pueblos indígenas, la cual no se ha podido recuperar en los más de quinientos años que han transcurrido desde entonces (Hernández and Herrerías, 1998).

Los cambios alimentarios ocasionados por el colapso que sufrieron las culturas indígenas como resultado de la conquista, también contribuyeron a su abandono.

A diferencia del maíz y el frijol, que con el correr del tiempo han llegado a ser dos de los principales cultivos del mundo, el amaranto fue desplazado y hoy día casi no se aprovecha. La mayor parte de la población mundial obtiene ahora su energía y proteínas de tan sólo 20 especies: cereales –trigo, maíz, arroz y sorgo-; tubérculos –papa, camote y calabaza-; leguminosas –frijol, cacahuate y soya-, además del azúcar de caña y de betabel (Morales et al., 2009).

Esta crisis está provocando un descenso aún mayor en los niveles de vida de la población, situación que conlleva un deterioro substancial de la dieta familiar (Hernández and Herrerías, 1998).

Para diversificar la base de la alimentación de los humanos es preciso que se reconozca la importancia de cultivos como el del amaranto, que por diferentes razones han caído en el olvido. Hace apenas un siglo, la soya, el girasol y el cacahuete se consideraban productos de escaso valor; hoy, se encuentran entre los más importantes del mundo. El amaranto también podría alcanzar una posición similar y es capaz de desempeñar un papel sobresaliente. Por ello, diversos grupos de investigadores nacionales e internacionales han emprendido estudios tendientes a recuperar y revalorar su cultivo, que tiene un prometedor potencial de explotación (Chávez-Servín et al., 2012; Morales et al., 2009).

El amaranto puede aportar alimento a la familia a todo lo largo del ciclo de cultivo por su abundante producción de hojas. Quien lo siembra en su lote familiar obtiene sin costo las hojas necesarias para la alimentación familiar. Una de las mejores posibilidades que tenemos para mitigar y revertir los efectos del subdesarrollo mental por deficiencia alimenticia, principalmente por escasez y aún carencia de proteínas y otros nutrimentos fundamentales, se sustenta en el cultivo del amaranto, defendiendo a los campesinos mexicanos de bajos ingresos contra la desnutrición severa que los amenaza (Hernández and Herrerías, 1998).

De acuerdo con todas las características antes mencionadas que hacen del amaranto un alimento muy importante en México, Hernández y Herrerías (1998) comentan que utilizando los cuatro granos básicos que constituyeron la alimentación cotidiana de los aztecas se puede obtener una dieta balanceada que rebasa los parámetros establecidos en la actualidad por la Organización Mundial de la Salud y la de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO-OMS, ONU). Mediante la ingesta diaria de 800 gramos de una combinación de maíz (300), frijol (200) chíia (200) y amaranto (100) se logra superar los requerimientos de energía, proteína, lípidos, calcio, fósforo, vitamina A y vitamina C, y casi suficientemente se cubren los de tiamina, riboflavina y niacina.

En esta investigación se realizó una búsqueda detallada de la historia del amaranto en nuestro país, se recuperó el significado de esta planta para nuestros ancestros y hoy buscamos hacer uso de toda esta valiosa información para recuperar el valor perdido del amaranto, aunado a esto, aportamos información científica innovadora y de utilidad para la producción agrícola nacional de esta planta, así como para la

línea de investigación cuantitativa que se relaciona con sus diferentes métodos de cultivo.

2.2 Características Generales del Amaranto

Es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, especie anual de crecimiento rápido, herbácea o arbustiva de diversos colores (verde, morado, café o púrpura con distintas coloraciones intermedias), y se reproduce mediante la autopolinización, principalmente por la acción del viento, resiste a la sequía y tiene la capacidad para desarrollarse en terrenos de temporal y soportar diferentes climas. Sus semillas se utilizan como cereal ya que poseen características similares a éste y el sabor de ambos es muy parecido (Morales et al., 2009).

La planta de amaranto se puede aprovechar en una extensa variedad de formas, como grano, como verdura o como forraje, por lo que los consumidores pueden tomar ventaja de ello para diferentes usos, como la harina de semillas, ensaladas de hojas frescas, inflorescencias como fuente de tinte natural de color rojo, o productos de desecho como alimento de animales (Juan et al., 2007). Actualmente, con los tallos de las hojas se puede elaborar papel de textura artística que merece un precio elevado y el forraje obtenido es un excelente alimento para rumiantes. Con estos usos se ve con claridad que la planta se aprovecha íntegramente (Becerra, 2000).

Es también un cultivo altamente eficiente que puede prosperar en condiciones agroclimáticas adversas, tales como sequía, altas temperaturas y suelos salinos (Becerra, 2000). Con prácticas adecuadas de cultivo se puede cosechar en tierras de temporal, como lo son la mayoría de las tierras agrícolas disponibles en el país. Se adapta a diferentes altitudes, climas, y tipos de tierra, desde el caluroso nivel del mar hasta las montañas templadas o semifrías. Se produce en regiones semiáridas, con lluvia desde 400 milímetros, hasta zonas tropicales con 1300 milímetros de precipitación. Se siembra desde el nivel del mar hasta cerca de 3000 metros de altitud, aunque es muy sensible a fríos excesivos, por lo que proporciona un mayor rendimiento creciendo en temperaturas elevadas (Hernández and Herrerías, 1998).

La familia Amaranthaceae se compone de 60 géneros y alrededor de 800 especies, 60 de estas especies son cosmopóliticas y crecen particularmente en sitios perturbados por el hombre considerándose como malezas (Becerra, 2000), de esas 60 especies, sólo 3 se consideran buenos productores de semillas: *A. hypochondriacus* (la variedad principal cosechada en México), *A. cruentus* y *A. caudatus* (Millán et al., 2012). La especie *A. hypochondriacus* es la más robusta y de mayor rendimiento de los tipos de amaranto de grano (Morales et al., 2009).

La semilla es pequeña, lisa, brillante de 1-1,5 mm de diámetro, ligeramente aplanada, de color blanco, aunque existen de colores amarillentos, dorados, rojos, rosados, púrpuras y negros; el número de semillas varía de 1000 a 3000 por gramo (Chagaray, 2005).

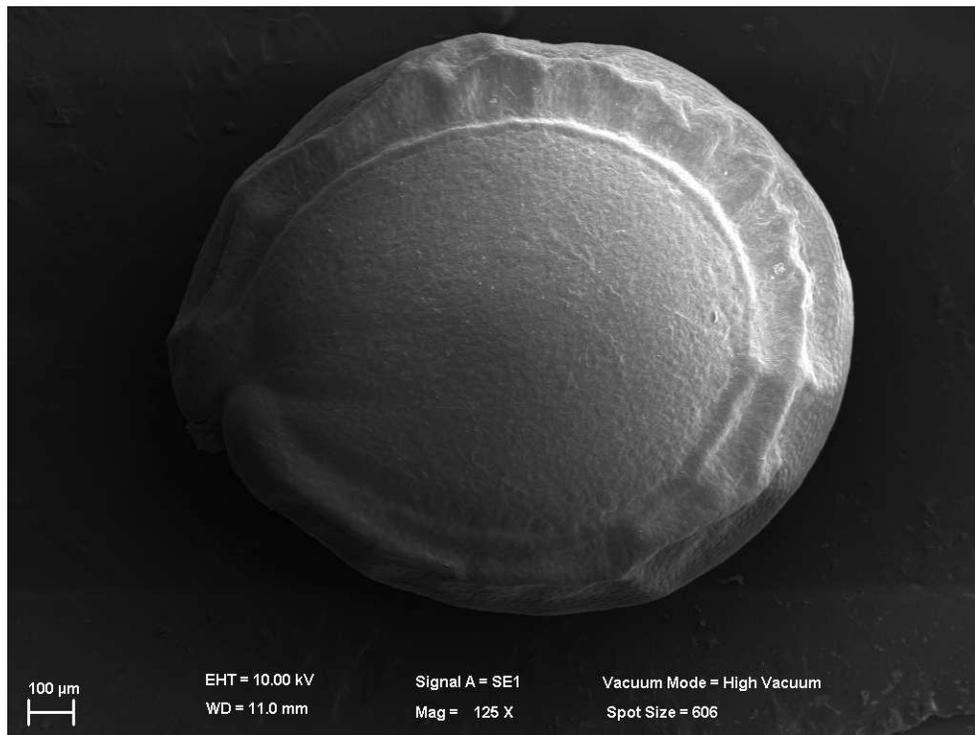
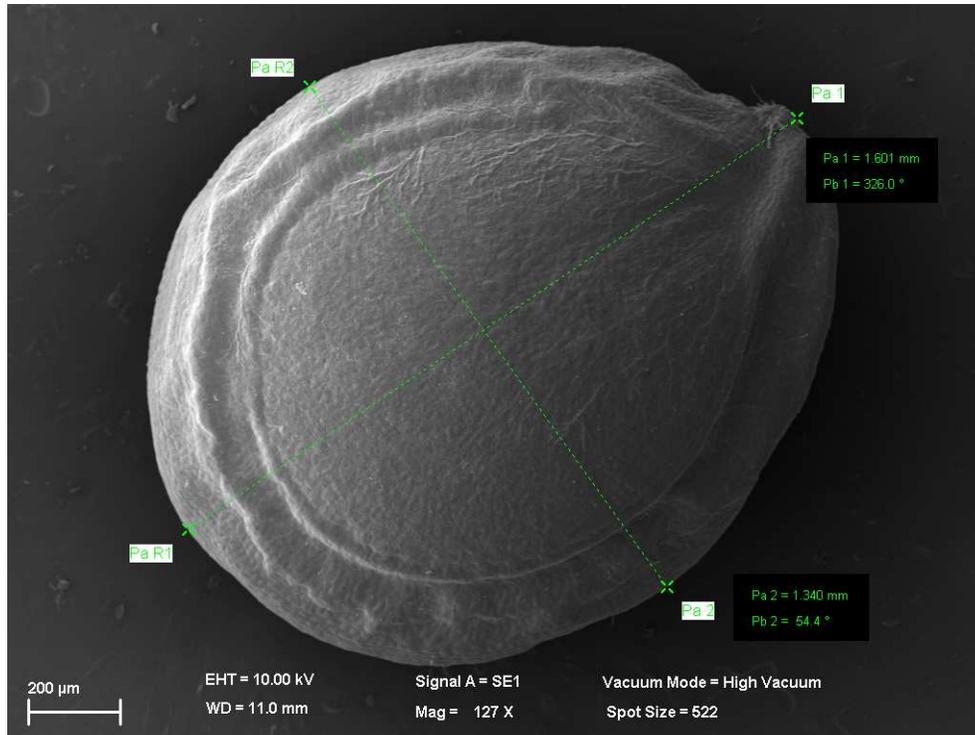


Figura 1 Imágenes del grano de amaranto en un microscopio de barrido. Arriba se muestran las dimensiones en sus ejes latitud y longitud, abajo se muestra la superficie del grano.

La semilla o grano del amaranto posee características nutrimentales muy interesantes; una de las más importantes es su contenido y calidad de proteínas, pues su aporte de aminoácidos dispensables es superior al de los cereales (Fidantsi and Doxastakis, 2001). Se ha informado que el contenido de proteínas crudas de diversas variedades de amarantos va de 13 a 18% (Becker et al., 1981; Calzetta et al., 2004; Lorenz and Gross, 1984; Teutonico and Knorr, 1985). Pero su importancia no radica sólo en la cantidad sino en la calidad de la proteína, ya que presenta un excelente balance de aminoácidos. Por su composición, la proteína del amaranto se asemeja a la de la leche y se acerca mucho a la proteína ideal propuesta por la FAO para la alimentación humana. Tiene un contenido importante de lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana y que comúnmente es limitante en otros cereales (Becerra, 2000).

El amaranto cumple satisfactoriamente con los requerimientos de aminoácidos esenciales según los estándares para adultos establecidos en 1985 en el informe conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Universidad de Naciones Unidas (UNU) (FAO/OMS/UNU, 1985) (Morales et al., 2009). También fue seleccionado por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, como uno de los 36 cultivos más prometedores por sus diferentes cualidades. En cuanto a su calidad según la FAO (*Food and Agricultural Organization / Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*) y la OMS (*Organización Mundial de la Salud*), sobre un valor proteico ideal de 100, el amaranto posee 75, la leche vacuna 72, la soja 68, el trigo 60 y el maíz 44, haciendo al amaranto un cultivo viable para su producción (Porr, 2009).

Un reconocimiento más para esta planta es que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Estadounidense del Espacio y la Aeronáutica (NASA) seleccionaron al amaranto como cultivo CELSS (Controlled Ecological Life Support System, ya que la planta remueve el dióxido de carbono de la atmósfera y al mismo tiempo, genera alimento, oxígeno y agua para astronautas). En 1985 el amaranto se cultivó, germinó y floreció en el espacio exterior durante el vuelo orbital de la nave Atlantis. El impulsor de esta acción fue el doctor Rodolfo Neri Vela, primer

astronauta mexicano (Asociación Mexicana del Amaranto, A. C.) (Morales et al., 2009).

Las semillas de *A. hypochondriacus* L. (la variedad principal crecida en México) contienen 15% - 20% de proteína rica en lisina, 58% - 66% de almidón, 6% - 9% de fibra cruda y 6% - 8% de los lípidos altamente insaturados (Millán et al., 2012) donde el ácido linoleico, que es un ácido graso indispensable, es el principal componente (Morales et al., 2009). Tiene concentraciones particularmente elevadas de calcio (250 mg/100 g) y hierro (15 mg/100 g) -10 y 4 veces mayor, respectivamente, que las que se encuentran en el trigo (Millán et al., 2012).

El Department of Agriculture Forestry and Fisheries (2010), informa que el amaranto es utilizado en África y Asia por sus cualidades hídricas y por ser rico como fuente de Calcio, Hierro y vitaminas A y C. Por estas razones, el amaranto podría contribuir de forma destacada a la superación de las deficiencias nutrimentales que padece gran parte de la población de los países latinoamericanos (Morales et al., 2009).



Figura 2. Imágenes de la planta de amaranto en el cultivo de ambiente protegido del presente estudio.

El tallo de la planta de amaranto es cilíndrico y anguloso con gruesas estrías longitudinales que le dan una apariencia acanalada, alcanza de 0.4 a 3 m de longitud, cuyo grosor disminuye de la base al ápice (Chagaray, 2005).

El valor nutrimental de las hojas de amaranto ha sido también ampliamente estudiado. Se ha encontrado que la hoja contiene altos valores de calcio, hierro,

fósforo y magnesio, así como ácido ascórbico, vitamina A y fibra, mayores a los de la espinaca. El cultivo de amaranto para verdura requiere mayor humedad, ya que se ha observado que bajo condiciones de estrés hídrico las hojas contienen altos niveles de oxalatos y nitratos, que pueden tener efectos adversos para la nutrición humana. No obstante, al hervir las hojas la concentración de estos compuestos disminuye (Becerra, 2000).

La planta de amaranto tiene usos y aplicaciones diversos para el consumo humano, similares a los de los cultivos básicos, principalmente el maíz. La hoja del amaranto es excelente para su consumo en fresco y por su sabor tan suave se puede integrar a una enorme variedad de guisos, sin modificar su sabor o apariencia. Las hojas de amaranto (quintoniles) se pueden aprovechar para la elaboración de aguas frescas, ensaladas, sopas, jugos, guisos, tortillas, tamales, etcétera (Morales et al., 2009).

Este estudio contribuye a la información que necesita la industria alimentaria en su búsqueda de satisfacer las nuevas necesidades de la población con productos innovadores que aporten a la dieta humana componentes no nutritivos pero benéficos para el buen funcionamiento del cuerpo. En este trabajo se aporta información con respaldo científico que avala los cultivos de amaranto en campo abierto y su producción de antioxidantes, para así promover su producción a mayor escala a nivel nacional, en favor de recuperar su consumo en la población mexicana y su uso en la industria alimentaria.

2.3 Importancia del Amaranto en México

En México, las entidades productoras más importantes ocupan parte de la cuenca de México, Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Oaxaca y Michoacán, con rendimientos promedio de entre 1100 y 1400 Kg/ ha. La producción en la zona rural del Distrito Federal se realiza principalmente en la delegación Xochimilco. En cuanto a la producción nacional de amaranto, 51% se obtiene de Puebla, 22% de Morelos y el resto en Tlaxcala, Distrito Federal, Estado de México y Guanajuato. Todos estos cultivos se realizan en su mayoría en campo abierto, con la variante del tipo de siembra; directa, o por trasplante, comenzando su siembra alrededor del mes de junio, y la cosecha alrededor de diciembre para el

cultivo por trasplante y alrededor de octubre por siembra directa (Morales et al., 2009).

Ya que la situación nacional de la producción en el sector primario se encuentra en niveles muy bajos, representando el 4.2% del Producto Interno Bruto en cuanto a Ganadería, Agricultura, Aprovechamiento forestal, Pesca y Caza (Escalante-Semerena and Catalán, 2008) el aprovechamiento del amaranto dependerá de la habilidad para desarrollar tecnologías para producir alimentos a partir de esta planta, sin embargo, la producción en el país no alcanza los niveles suficientes para impulsar una industrialización de grandes alcances (Becerra, 2000). Se tendrá que fomentar la comercialización, pues todavía tiene un nivel de desarrollo limitado y el movimiento del mercado es local, se deben adoptar estrategias de promoción y de mercado que difundan el contenido nutricional del amaranto. Las tecnologías generadas y desarrolladas para el amaranto están en fase de prueba y será necesario extenderlas a todos los productores (Escalante, 2010).

Uno de los propósitos más importantes de este estudio es aportar información científica que avale la producción de amaranto en cultivos a campo abierto, pero también contribuir con información valiosa cuando se prefiera el uso de nuevas tecnologías y contar con antecedentes científicos cuando se desee realizar estudios pertinentes con respecto a las cualidades nutrimentales del amaranto proveniente de diferentes métodos de cultivo. De esta manera se abre un camino al resurgimiento del amaranto en México en lo que se refiere a su producción.

2.4 Importancia del estudio del Amaranto

La semilla de amaranto carece de gluten y contiene altas concentraciones de vitaminas y compuestos fenólicos (Mustafa et al., 2011), lo que la hace más interesante como alimentos alternativo. Los compuestos fenólicos han sido objeto de múltiples investigaciones científicas ya que se ha demostrado que tienen una actividad metabólica importante en el organismo relacionada con la prevención de diversas enfermedades crónicas. Los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos son los polifenoles más abundantes en plantas; de ellos los ácidos flavonoides y fenólicos constituyen, respectivamente, el 60 y 30% del total de polifenoles ingeridos en la dieta (Gil, 2010). El creciente interés de estos

compuestos, además de vitaminas como A, E y C ha incrementado la atención de los científicos debido a que han mostrado efectos y actividades biológicas importantes. Cubren una amplia gama de actividades metabólicas y tienen diferentes funciones en el organismo que recaen sobre la prevención o el tratamiento de varias enfermedades, entre ellas, enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares (ECV) y obesidad (Gil, 2010). De ahí la importancia de conocer el aporte de compuestos antioxidantes que tiene el amaranto en nuestra dieta, ya que hasta ahora ha sido utilizado con diversos propósitos que incluyen usos potenciales; por ejemplo, suplementos en cereales, en el desarrollo de productos como alimentos para infantes (papillas, bebidas), sopas de pasta, galletas, barras para preescolares, harinas de maíz hasta en 20% en la elaboración de tortillas, etcétera (Morales et al., 2009).

El amaranto, ancestral y a la vez contemporáneo, antes sagrado y hoy necesario, es un alimento esencial gracias al reconocimiento de sus propiedades nutricias. En la actualidad existen en México organizaciones que promueven el desarrollo sustentable del amaranto en comunidades donde se le utiliza como estrategia para abatir la desnutrición y la pobreza. La producción, transformación e incorporación del amaranto tanto en las recetas tradicionales, como en las innovaciones gastronómicas, forman parte importante de la estrategia para la promoción e incorporación del amaranto en la dieta de la población (Chávez-Servín et al., 2012; Morales et al., 2009). Así como estas organizaciones hacen su trabajo de promoción, en el área de investigación cuantitativa se busca promover el estudio de las propiedades del amaranto en distintas líneas de investigación. El propósito de este estudio, al igual que el de Cabrera-Baeza (2012) en su trabajo sobre el efecto de siembra en la calidad nutrimental del amaranto, es aportara la ciencia información valiosa respecto a la composición nutrimental de cuando esta planta es cultivada en diferentes métodos de cultivo como invernadero y campo abierto, en beneficio del sustento científico que necesita la producción de amaranto a nivel nacional, lo que representa un parteaguas en esta línea de investigación y permite observar aún un largo camino en el estudio del amaranto como un alimento con alto potencial de explotación.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La imperiosa necesidad de disponer de alimentos, en particular en los países de menor desarrollo, hace necesaria, entre otros factores fundamentales, una mayor producción agrícola de cultivos capaces de suministrar a la población una adecuada cantidad de productos para diversificar su dieta y asegurar así una adecuada ingestión de nutrimentos (Morales et al., 2009).

La situación nacional de la producción en el sector primario representa uno de los mayores retos de nuestro tiempo, por lo que es imprescindible alentar más a las alternativas de las actividades agrícolas, que permitan aumentar la productividad del sector primario en nuestro estado, en términos de rendimiento sin dejar de vigilar aspectos importantes como es el aporte nutrimental del producto cosechado.

Es necesario impulsar una mayor producción agrícola e impulsar a la producción de una adecuada cantidad de productos para diversificar la dieta del ser humano y asegurar así una ingestión de nutrimentos recomendable para la población. La implementación de invernaderos en cultivos con gran potencial agrícola como lo es el amaranto, que permita una mayor producción y rendimiento, podría responder a esta problemática a nivel nacional.

Sin embargo, se pretende contribuir con bases científicas a la iniciativa de algunas organizaciones nacionales que promueven la producción de amaranto a menor escala y que ésta permanezca en las pequeñas localidades, siendo adoptada por las personas para su consumo en huertos de traspatio con el uso de suelo disponible.

La composición nutrimental de los granos de amaranto, puede ser afectada por varios factores, entre ellos, el clima, la exposición directa al sol, las condiciones en que son cultivados y el grado de maduración de la planta. Se sabe también que el estrés ambiental, estimula la producción de compuestos antioxidantes por las plantas, por lo que probablemente el producir un ambiente favorable para el crecimiento de amaranto, pueda cambiar la producción de éstos. Aquí la importancia de evaluar el incremento del rendimiento del Amaranto, no solo en términos de cantidad, sino de composición nutrimental para tener un mayor

sustento científico que muestre las diferencias en la composición nutricia y capacidad antioxidante de la planta con el uso de invernaderos en comparación con cultivos a campo abierto.

No se encuentran disponibles estudios que evalúen la posible modificación del contenido de nutrimentos y antioxidantes en hojas y granos de amaranto cultivado en ambiente protegido en comparación con cultivos en campo abierto. Una de las tareas de los investigadores es mostrar si el incremento en el rendimiento de un cultivo al modificar la exposición a las condiciones ambientales va en detrimento de su composición nutricia y su contenido de antioxidantes, o si se observa una mejora en la composición bromatológica y de compuestos nutraceuticos que impliquen ventajas para el consumo humano.

IV HIPÓTESIS

El contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en hojas y granos de amaranto será mayor en el cultivado en campo abierto en comparación con los cultivos en ambiente protegido. Asimismo se observará un menor contenido de factores antinutricios en las muestras de amaranto producidas en invernadero.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante y factores antinutricios en hojas y granos de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) de la variedad Revancha, cultivados bajo ambiente protegido y en campo abierto.

5.2 Objetivos específicos

Comparar el contenido de Ácido Fítico y Actividad Inhibitoria de Tripsina en la hoja y grano de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) de la variedad Revancha, cultivados bajo ambiente protegido y en campo abierto.

Comparar la capacidad antioxidante en hoja y grano de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) de la variedad Revancha, cultivado bajo condiciones de ambiente protegido y campo abierto.

Comparar el contenido de Antocianinas y Taninos condensados en hoja y grano de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) de la variedad Revancha, cultivado bajo condiciones de ambiente protegido y campo abierto.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Universidad Autónoma de Querétaro y se contó con equipos y materiales de acuerdo a lo siguiente:

6.1 Sitio experimental

El cultivo se realizó en la Facultad de Ingeniería campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, localizada en la Carretera a Chichimequillas, El Marqués, Amazcala Qro., México C.P 76130.Éste lugar se encuentra a una mediana altura de 1920 metros sobre el nivel del mar, se realizó en un invernadero de 100 m² para cultivo en condiciones protegidas y 100 m² para el cultivo en campo abierto.

Los análisis de laboratorio se realizaron en la Facultad de Ciencias Naturales Campus Juriquilla de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui Qro., México C.P. 76230.

6.2 Establecimiento del cultivo

Se realizó con un sistema de riego mediante siembra directa: en campo abierto y en condiciones de ambiente protegido.

El ciclo de producción fue de 5 meses y se realizó una bitácora de campo que incluyó datos de crecimiento, para generar reportes sobre granos/ planta, granos/ superficie, altura de la planta, diámetro de tallo y número de hojas.

Este cultivo requirió de una buena preparación del suelo, debido al tamaño pequeño de sus semillas. Para cada uno de los sistemas de cultivo seleccionados para este estudio, siembra directa en campo abierto y ambiente protegido, se aflojo el suelo mediante el uso de una retroexcavadora, surcado y nivelación del suelo de forma manual, en un espacio de 100 m² para cada uno de los sistemas evaluados.

El invernadero está orientado norte – sur, con un sistema de riego por cintilla con orificios cada 12 pulgadas, de la marca eurodrip calibre 8 mil con un gasto de 0.4 gph, la ventilación es por medio de un ventilador de 50 pulgadas con un motor de 0.5 hp, como sistema de automatización se programaron 5 riegos cada 8 minutos del 27/03/12 al 16/04/12 y 2 riegos de 8 minutos hasta el 17/04/12.

Se utilizó semilla de Amarantho certificada por el INIFAP de la especie *A. hypochondriacus* de la variedad “Revanca”. El sistema de cultivo bajo condiciones de ambiente protegido, se realizó en el interior de un invernadero de la facultad de ingeniería de la UAQ que se encuentra en Amazcala. Las siguientes actividades se realizaron de manera igual y en paralelo para los dos sistemas a evaluar:

Se realizaron los surcos manualmente, con un espacio entre ellos de 60 cm y entre planta y planta 30 cm aproximadamente, con una profundidad entre 5-10 cm. Se humedeció el suelo previamente para que existiera suficiente humedad para asegurar la germinación. Las semillas se sembraron en lo alto del surco, depositando una pizca de semillas (8 semillas aproximadamente), cubriéndolas con un poco de tierra a no más de 2 cm de espesor para evitar que la capa de tierra que cubre la semilla no sean tan gruesa que evite que nazca o que se pudra.

Después de 20-30 días del sembrado, en que las plantas tuvieron aproximadamente una altura de entre 15 a 20 cm, se procedió a deshierbar cualquier planta invasora. Asimismo se quitaron los tallos y plantas débiles y se dejaron 2 contiguos de los más robustos o 3 medianos.

6.3 Monitoreo de temperatura y humedad

El monitoreo de temperatura y humedad se realizó mediante un sensor de la marca SPECTRUM TECHNOLOGIES, INC. Cuyo sensor es el Watch Dog 1000 Series

Micro Stations. Se realizaron mediciones cada hora durante toda la duración del cultivo.

6.4 Selección de la muestra

Para cada uno de los sistemas de cultivo, se almacenó el producto en bolsas de 10Kg por ser fáciles de manejar y estibar. Para cada uno de los puntos de muestreo en los costales, se tomó una muestra primaria mayor de 500 g (de cada uno de las bolsas), se colocó en un nuevo costal destinado a reunir la totalidad de muestras primarias

La suma de las muestras primarias, constituyó una muestra compuesta, misma que se homogenizó por vaivén dentro de la bolsa. El grano para las determinaciones bromatológicas se almacenó en bolsas de plástico de 100g aproximadamente para cada una de las determinaciones de laboratorio, previa limpieza y molienda del grano para las subsecuentes determinaciones analíticas. Se utilizó 1 muestra compuesta para cada una de las determinaciones de laboratorio de cada sistema de cultivo.

6.5 Determinaciones analíticas

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado. A continuación se detalla el procedimiento para la realización de cada uno de los análisis de laboratorio.

6.5.1 Determinación del contenido de Ácido Fítico

Los alimentos de origen vegetal contienen una serie de sustancias denominadas *factores antinutricios*, capaces de disminuir la disponibilidad de los nutrimentos indispensables. A este grupo de sustancias pertenece el ácido fítico o ácido mioinositolhexafosfórico (IP6), que se encuentra en cereales y leguminosas. Este se considera un factor antinutricio debido a que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales. En cereales y leguminosas constituye aproximadamente entre 1 % y 2 % del peso de la semilla, incluso puede alcanzar cantidades de 3 % a 6 % en algunos cereales.

Debido a que la molécula de ácido fítico contiene seis grupos fosfato con cargo es excelente agente quelante que forma complejos con cationes minerales y proteínas. Muchos de estos complejos son insolubles y, si se considera que la solubilidad es un factor esencial para que los nutrimentos sean absorbidos, la presencia de ácido fítico hace que se reduzca la biodisponibilidad de éstos y, en consecuencia, va a influir en el valor nutritivo de los alimentos. Por lo que se refiere al fósforo presente en la molécula de fitato, el hombre no lo puede aprovechar porque el organismo no produce la enzima necesaria para hidrolizar el ácido fítico (fitasa) y liberar así el fósforo de este compuesto. Esta capacidad del IP6 para formar complejos la tiene el mioinositolpentafofato (IP5) que resulta de la hidrólisis del ácido fítico por medio de la enzima fitasa; sin embargo, los inositoles fosfato con cuatro o menos grupos fosfato al parecer no poseen ningún efecto negativo en la absorción de minerales.

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 1.

6.5.2 Determinación de Actividad Inhibitoria de Tripsina

Los factores antinutricionales pueden clasificarse como termo estables y termo lábiles; los factores termo estables incluyen: factores antigénicos, oligosacáridos y aminoácidos no proteicos tóxicos, saponinas, estrógenos, cianógenos, fitatos; siendo los más importantes: los factores antigénicos, los oligosacaridos, las saponinas y los fitatos. Así mismo, entre los factores termo lábiles se encuentran, los inhibidores de proteasas (tripsina y quimotripsina), lectinas, goitrogenos y antivitaminas; siendo los más importantes los inhibidores de proteasas y las lectinas.

Las proteínas antigénicas pueden producir reacciones inmunes locales y sistémicas junto con una reducción de la digestibilidad de la proteína, anomalías en el movimiento intestinal, disminución de la absorción de nutrimentos, predisposición a diarreas y pérdidas de peso.

La tripsina al ser una proteasa, permite la hidrolización de proteínas a aminoácidos, los cuales son absorbidos por el organismo humano. Los inhibidores de esta proteasa se pueden encontrar comúnmente en leguminosas y cereales, y al unirse con la enzima tripsina forman complejos inactivos (Gil, 2010).

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 2.

6.5.3 Determinación Capacidad Antioxidante (AntioxidanAssay Kit)

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades, por ello es que el uso de antioxidantes, es estudiado de forma intensiva. Actualmente, se sabe que tanto por causas ambientales (radiación), así como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro propio metabolismo, surgen algunas moléculas que nos pueden provocar daño. A estas se les conoce como especies oxígeno reactivas (ROS), que se asocian a enfermedades como cáncer, problemas cardíacos o al natural envejecimiento humano. Entre los problemas que originan figuran: destrucción de paredes celulares, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético.

Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en, prácticamente, todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales.

La oxidación de las moléculas biológicas, membranas y tejidos, es inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, siendo la causa del aumento de la incidencia de enfermedades degenerativas en los seres humanos. El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Estas especies son oxígenos activos incluyen el radical superóxido (O_2^\ominus), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical óxido nítrico (NO^\cdot) y el oxígeno singulete (1O_2). Además, la radiación cósmica y la radiación electromagnética de baja longitud de onda (por ejemplo los rayos gama) pueden dividir el agua en el organismo para generar el radical hidroxilo, OH^\cdot . Este radical, débilmente reactivo, una vez producido ataca a cualquier molécula que esté cerca, siendo su vida media extremadamente pequeña y reaccionando en su punto de formación dejando tras de sí una secuela de reacciones en cadena, de radicales libres en propagación. Asimismo, cierta parte de los superóxidos son producidos por reacciones químicas, en las que muchas moléculas del cuerpo interactúan directamente con el Oxígeno, para producir superóxido. Ejemplos de estas moléculas constituyen las catecolaminas, tetrahidrofolatos y algunos componentes de la cadena mitocondrial y otras cadenas de transporte de electrones. Esta producción de superóxido es inevitable. Otro radical libre fisiológico es el óxido

nítrico (NO) que es producido por el endotelio vascular como factor relajante del endotelio vascular (EVRF) y también por los fagocitos y el cerebro. El óxido nítrico, tiene muchas funciones fisiológicas útiles pero un exceso puede tóxico.

En nuestro organismo, la producción de los radicales libres ha permitido desarrollar diversos mecanismos de defensa antioxidante, como medios de protección. La enzima superóxidodismutasa remueve el O_2° convirtiéndolo en H_2O_2 , el cual es transformado por las enzimas catalasa y Glutación peroxidasa, en agua (H_2O). Asimismo, existen moléculas que remueven los radicales libres por reacción directa (no catalítica) tales como: el glutación reducido, los tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C). Cuando la defensa antioxidante, no es cien por ciento eficiente, incrementa la formación de radicales libres en el organismos; a esto se denomina estrés oxidativo. Ante este estrés oxidativo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula. En las frutas, leguminosas y algunos vegetales se encuentran muchas sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando nuestra defensa antioxidante, reportándose que son capaces de detener o prevenir el desarrollo de tumores y los efectos bioquímicos asociados con la progresión de los mismos; este potencial se atribuye, principalmente, a sus propiedades antioxidantes.

Se ha acumulado información sobre la capacidad de algunos componentes de los alimentos para disminuir o prevenir los procesos de oxidación celular (Guanábana, uva, chirimoya, guayaba, semilla de marañón, carambola, plátano verde, noni, ciruela, granadilla, mango, papaya, mamey, naranja, limón, maracuyá, zapote, níspero, jagua, entre otros). Un antioxidante, es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. El sistema antioxidante de defensa está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxidodismutasa, catalasa, glutación peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, Beta-caroteno, vitamina C, Glutacion reducido, albúmina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros.

Algunos de los antioxidantes, son vitaminas (aminas indispensables para la vida, tales como la vitamina A, C y E; otros son flavonoides (quercetina, catequina), antocianinas, carotenoides o ácidos fenólicos (ácido caféico y ácido clorogénico).

Actualmente, existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se pueden mencionar el uso del 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS, test del status antioxidante total), poder antioxidante reductor férrico (FerricReducing/antioxidantPower: FRAP), entre otros.

El método utilizado por el presente Kit, está basado en la capacidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS por metmioglobina.

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 3.

6.5.4 Determinación de Capacidad Antioxidante por el Método FRAP

La ventaja del método FRAP es su capacidad para determinar cuantitativamente la cantidad total de antioxidantes o reductores en muestras como alimentos, extractos, suplementos o tejidos. El método FRAP es también el único que mide directamente antioxidantes o reductores en la muestra. Los otros métodos son más indirectos, pues miden la inhibición de las especies reactivas (radicales libres) generadas en la reacción, y estos resultados también dependen estrechamente del tipo de especies reactivas usadas. En cambio, el método FRAP usa antioxidantes como reductores en una reacción tipo redox calorimétrica. Con el método FRAP no se requiere un pretratamiento de la muestra, los factores estequiométricos son constantes y la linealidad se mantiene en un amplio intervalo (Salas, 2005).

Con el fin de valorar la eficacia de los antioxidantes de la dieta, tanto en forma pura como en extracto de los alimentos, así como para determinar la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo como un índice del estatus antioxidante in vivo, se han desarrollado diferentes métodos que se fundamentan en diferentes mecanismos. La mayor parte de los métodos se basan en una reacción de transferencia de un electrón (SET por sus siglas en inglés) o en una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés) entre un antioxidante y el radical libre. Dentro de los métodos que se basan en el mecanismo SET, en los que se valora la capacidad reductora del antioxidante, uno de los más utilizados de la reducción férrica, por sus siglas en inglés). Esta metodología consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (azul)

que se desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe⁺³ se reduce a TPTZ-Fe⁺². De esta forma, la capacidad antioxidante que presentan los extractos de diferentes frutas y vegetales se mide como la capacidad reductora del extracto. En cuanto al mecanismo HAT, en donde el antioxidante y el radical peroxilo forman una asociación estable mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante al radical, de forma que se detiene la reacción de oxidación en cadena, se encuentra el método de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno, por sus siglas en inglés).

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 4.

6.5.5 Determinación de Capacidad Antioxidante por el Método DPPH

Se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos (Coba Pablo et al. 2010).

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Willams et al, DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; (Dr. Castañeda C. B et. Al., 2008).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidantes se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra (Coba Pablo et al. 2010).

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 5.

6.5.6 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Los antioxidantes naturales son preciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud (funcionales o nutraceuticos). La importancia de los antioxidantes es crucial para la salud, debido a su capacidad de neutralizar

radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados (Thomas, 2000), siendo responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, aterosclerosis, muerte celular y cáncer, asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrófilos dañadores del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de pre-carcinógenos, hasta carcinógenos (Friedman, 1997). El antioxidante al colisionar con el Radical Libre (RL) le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (Perón et al., 2001; Zheng et al., 2001).

Este método colorimétrico permite el análisis de compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados (fenoles, ácido tánico, taninos, ligninas, ácidos húmicos, proteínas, etc.).

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato) a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de una determinación espectrofotométrica a 750 nm.

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 6.

6.5.7 Determinación de Antocianinas Totales

Las antocianinas (del griego Anthos: flor y kyanos: azul) son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas que pertenecen al grupo fitoquímico de los fenoles y dentro de ellos se incluyen a los flavonoides, los cuales son responsables de pigmentar de forma natural a los tejidos que los producen; en este grupo de metabolitos secundarios, que se diferencian entre sí por el grado de oxidación que presentan en el tercer anillo que los conforma, se encuentran las flavonas, los flavonoles, las flavononas, las isoflavonas y las antocianinas (Ming et al., 2003). Las antocianinas naturales más comunes son las 3-O-glicosidos y las 3,5 di-O-glucósidos.

Las antocianinas son los componentes que otorgan a las plantas colores rojos, azules, morados, particularmente en partes como frutos, flores y hojas. Son pigmentos solubles en agua, lo que facilita su incorporación en los sistemas acuosos alimentarios.

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma del oxonio coloreado predomina a pH 1,0 y la forma hemicetal incolora a pH 4,5. El

método del pH diferencial se basa en esta reacción y permite segura y rápidamente medir el total de antocianinas monoméricas.

Abdel y Hucl (1999) proponen un método para la cuantificación de antocianinas totales en cereales, en el cual se realizan lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro. El objetivo de este método es obtener los aglicones, por separación de los azúcares y otras sustancias como ácidos ligados a la estructura antocianica, con el único propósito de identificar las antocianidinas (aglicones) presentes en el pigmento.

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 7.

6.5.8 Determinación de Taninos Condensados

La vainillina es un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermedio de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un compuesto de color rosa ligero a un intenso rojo cereza. La reacción se verifica entre la vainillina y los flavonoides como (+)-catequina.

El método de vainillina puede ser usado para cuantificar taninos en el rango de 5-500 µg. La cinética de la reacción del ensayo de vainillina depende de la estructura química de la muestra. Para que el ensayo de vainillina produzca resultados óptimos el tiempo de reacción para la (+)-catequina es de 20 minutos. Asimismo, el contenido en agua de la muestra debe ser bajo (ya que de lo contrario se produce una disminución de la absorbancia). La absorbancia (que disminuye por el efecto de la luz directa sobre la reacción) de los productos formados durante el ensayo se mide a 492 nm.

La descripción detallada del método se presenta en el ANEXO 8.

6.6 Análisis Estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para definir el comportamiento de las variables estudiadas, se utilizó promedio, desviación estándar, mínimo y máximo. Para comparar las variables estudiadas contra el sistema de cultivo (invernadero vs campo abierto) se utilizó la prueba *t* de student. Para analizar posibles cambios de las variables analizadas a lo largo del tiempo se utilizó un análisis de varianza

(ANOVA), seguido de una prueba *pos hoc* de Tukey. Para los análisis estadísticos se utilizó un intervalo de confianza del 95% y un valor de significación $p < 0.05$. El análisis de los datos se hizo con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 17.0.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Ácido Fítico

Tabla 1 Contenido de Ácido Fítico en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
Fitatos	Hoja 48 días	4.99 ± 0.0 ^a	4.87 ± 0.0 ^{a*}
g fitato de	Hoja 58 días	5.05 ± 0.0 ^b	4.76 ± 0.0 ^{b*}
sodio/100g de	Hoja 76 días	4.92 ± 0.0 ^c	4.83 ± 0.0 ^{c*}
materia seca	Grano	1.20 ± 0.0	1.88 ± 0.0 [*]

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando la misma columna, contrastando el tiempo.

Según los datos obtenidos en las muestras del ambiente protegido, éste fue superior en el contenido de Ácido Fítico en un 2.4%, 5.7% y 1.8% en las muestras de hoja de amaranto correspondientes al primer, segundo y tercer tiempo de muestreo, pero inferior en el caso del grano en un 36.2%.

Teutonico y Knorr (1985) señalaron que las semillas de *A. Cruentus* contienen de 5 a 5.8 gramos de fitato/100g, mientras que las semillas de *A. hypochondriacus* poseen de 5.2 a 6.4 gramos/100g (Morales et al., 2009). Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados en la bibliografía.

Según Wang, *et al.*, (1992) un incremento en la acumulación de ácido fítico se da principalmente en la maduración de la semilla aunque dicha acumulación ha sido interpretada por algunos autores como una manera de prevenir niveles excesivamente altos de fósforo inorgánico durante la maduración, la mayoría coincide en que su función principal es el almacenamiento de fósforo (Riera, 2011). El ácido fítico (inositol fosfato) es el principal anti-nutriente presente en los cereales, se sabe que se halla presente en altas concentraciones en granos de cereales y en leguminosas, puede inhibir de forma significativa la absorción de minerales mediante la formación de complejos insolubles con minerales, como el hierro no hemo, el calcio y el zinc; comprometiendo así el desempeño de las proteínas (Hurrell et al., 1992). Los fitatos se encuentran en toda la semilla de amaranto y la presencia de los compuestos fenólicos se reduce en 80% (Morales et al., 2009). Riera (2011) en su estudio sobre la determinación del contenido de

Ácido Fítico en granos andinos y su acción quelante con minerales, muestra la efectividad del proceso de cocción en húmedo para la disminución de ácido fítico en todos los granos del estudio. Lo cual podría atribuirse a cambios fisicoquímicos que sufre el grano y que le ayudan a degradar el contenido de ácido fítico que se experimenta con la cocción de los granos por la transferencia de calor, a este comportamiento hace referencia Viadel (2002) donde cita que el calentamiento en húmedo tiende primero a solubilizar y después a destruir ciertos componentes, esto se basa fundamentalmente en la activación de las fitasas endógenas de las semillas, que producen una degradación del contenido de ácido fítico. Se comprobó que es una molécula termolábil y por ende el tratamiento térmico reduce este problema al producirse una desfosforilación del ácido fítico. La cocción realizada tuvo buenos resultados demostrando que durante el procesamiento de las semillas, se produce la hidrólisis enzimática del ácido fítico debido a la activación de las fitasas endógenas. En el estudio de Riera (2011), la fritura y el tostado aplicado a las líneas y/o variedades en el estudio de granos andinos mostraron un notable incremento en el contenido de ácido fítico con respecto al valor encontrado en los granos nativos; esto se debe a que la aplicación de calor excesivo destruye por completo a las enzimas endógenas que ayudan a degradar el ácido fítico, así se concluyó que las temperaturas superiores a los 75 °C destruyen la estructura de las enzimas contenidas en el grano y reducen drásticamente su actividad fitásica. Por lo que el mejor método de cocción para el grano de amaranto es el hervido. Viadel (2002) también estudiaron el efecto del procesamiento térmico sobre algunas sustancias anti-nutricias de las leguminosas y concluyeron que la cocción produce una disminución de la actividad inhibitoria de la tripsina, una reducción del ácido fítico y un aumento de los taninos y catequinas (Riera, 2011).

7.2 Actividad Inhibitoria de Tripsina

Tabla 2 Contenido de Tripsina Pura Inhibida en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
AIT	Hoja 48 días	2.28 ± 0.1 ^a	2.52 ± 0.1 ^{a*}
mg tripsina pura inhibida /g de materia seca	Hoja 58 días	2.43 ± 0.0 ^a	2.59 ± 0.0 ^{a*}
	Hoja 76 días	2.19 ± 0.0 ^a	2.53 ± 0.1 ^{a*}
	Grano	2.78 ± 0.1	14.14 ± 0.1 [*]

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones \pm 1 DE. * Significa diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando la misma columna y contrastando el tiempo.

Los valores obtenidos en la prueba de Actividad Inhibitoria de Tripsina se muestran superiores en las muestras, tanto de hojas como grano, en el cultivo a Campo Abierto en un 9.5%, 6.1%, 13.4% y 80.3% respectivamente, en comparación con los resultados del cultivo en ambiente protegido.

La bibliografía reporta valores de Tripsina Pura Inhibida en harina de frijol crudo que oscila entre los 7.24-11.46 mg/g de muestra (Hernández and Escudero, 1993). Para el frijol Cowpea el valor es de 13.0 mg TI/g y para el frijol "ground" es de 15.68 mg TI/g (Egounlety and Aworh, 2003). El valor de Tripsina Pura Inhibida en algunas leguminosas es similar al encontrado en la muestra del grano del campo abierto.

Las plantas han desarrollado mecanismos para luchar contra organismos invasores. Una importante línea de defensa que las plantas tienen para luchar contra estos patógenos es a través de diversos inhibidores que actúan disminuyendo la actividad proteolítica. Suelen ser pequeñas proteínas que generalmente se presentan en altas concentraciones en los tejidos de plantas, llegando a contribuir hasta el 10% del contenido total de proteínas en estas. Se les ha detectado en hojas y principalmente en semillas (Ryan, 1990) e inhiben el crecimiento y el desarrollo de los animales que se alimentan de estas plantas. Algunos de los efectos observados en los animales son la disminución de la absorción de nitrógeno y un aumento en el tamaño del páncreas (Liener and Kakade, 1980). Estos factores se pueden definir como compuestos termo lábiles de naturaleza proteica, que alteran la digestión de las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas que se enfocan hacia la hidrólisis de las proteínas de la dieta; los más conocidos son los que reaccionan con proteasas de serina, como la tripsina y la quimotripsina. Los inhibidores de proteasas son los factores anti-nutricios más conocidos; encontrados principalmente en semillas crudas de leguminosas, amaranto y soya (Daffus and Slaughter, 1985). Los inhibidores de proteasas de plantas se han descrito como reguladores endógenos de la actividad proteolítica (Chaudhary et al., 2008; Franco et al., 2003).

Nagamatsuet al. (2004), estudió la intensidad de la luz y la actividad inhibitoria de tripsina en semillas y hojas de amaranto, los resultados arrojaron que las hojas de las plantas cultivadas bajo condiciones de luz solar plena mostraron una significativa mayor actividad del inhibidor de tripsina que las hojas de las plantasparcialmente sombreadas con redes de plástico que atenuaban la luz solar hasta en un 30% y 50%, resultado similar a lo que obtuvimos en el presente estudio por el invernadero. Nagamatsu también sugiere que el aumento de los niveles de actividad del inhibidor de tripsina foliar en plantas expuestas a la luz solar, y que los inhibidores de tripsina en *A. hypochondriacus* podría tener un papel protector contra el estrés causado por la alta luz. Coincidiendo con Conconi et al. (1996), en un estudio en hojas de tomate, dónde sugiere que la luz ultravioleta activa la expresión de varios mecanismos de defensa de las plantas; y la acumulación de inhibidor de tripsina en las hojas de plantas de *A. hypochondriacus* expuestos a la luz solar podría haber sido, además de un aumento del grosor de la hoja, parte de un mecanismo de protección contra los dañinos rayos ultravioleta (UV), los niveles de luz presente en la intensa radiación solar.

Gran parte de la actividad de este inhibidor puede eliminarse utilizando diversos tratamientos como: procesos térmicos, la germinación y la fermentación; estos tratamientos desnaturalizan las proteínas mejorando su digestibilidad. Es recomendable que después de germinadas las semillas sean escaldadas con agua hirviendo por tres minutos para inactivar el 90% de sus inhibidores (Muzquiz, 2006).

7.3 Capacidad Antioxidante

7.3.1 Antioxidant Assay Kit

Tabla 3 Capacidad Antioxidante por medio de un Antioxidant Assay Kit.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
Kit	Hojas 48 días	93.25 ± 3.6 ^a	207.51 ± 13.0 ^{a*}
mg Ác.	Hojas 58 días	60.47 ± 1.6 ^b	186.06 ± 17.2 ^{a*}
Ascórbico/100 g	Hojas 76 días	90.73 ± 0.9 ^a	126.95 ± 2.6 ^{a*}
de materia seca	Grano	ND	ND

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa (p<0.05) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) comparando la misma columna, contrastando el tiempo.

Los resultados que se obtuvieron para determinar la capacidad antioxidante con el Antioxidant Assay Kit son estadísticamente significativos y esta capacidad es mayor en las tres muestras de hoja de amaranto en el cultivo a Campo Abierto en un 55%, 67.5% y 28.5%. Hay una disminución en la capacidad antioxidante a los 58 días (segundo muestreo) del cultivo en invernadero, mientras que la capacidad antioxidante del cultivo a campo abierto muestra variación en los tres tiempos de muestreo y hay una visible disminución ésta a lo largo del tiempo.

7.3.2 FRAP

Tabla 4 Capacidad Antioxidante por el método FRAP en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
FRAP	48 días	5.28 ± 0.2 ^a	8.35 ± 0.2 ^{a*}
gEq. Ác.	58 días	5.05 ± 0.1 ^a	7.25 ± 0.2 ^{b*}
Ascórbico/100g de	76 días	5.15 ± 0.1 ^a	7.71 ± 0.3 ^{a*}
materia seca	Grano	0.61 ± 0.0	0.64 ± 0.0

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa (p<0.05) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) comparando la misma columna y contrastando el tiempo.

Las cifras que muestran los resultados obtenidos en la prueba de Actividad Antioxidante por el método FRAP, son superiores en las tres muestras de hoja de amaranto cultivado a Campo abierto en un 36.7%, 30.3% y 33.2% correspondientes al primer, segundo y tercer tiempo de muestreo. Mientras que en la muestra de grano de amaranto no hay diferencia significativa. La capacidad antioxidante medida por el método FRAP se mantiene estable a lo largo del tiempo en las muestras de hoja del cultivo en invernadero. Las muestras del cultivo a campo abierto sufren variaciones, disminuyendo la capacidad antioxidante del primer al segundo muestreo y volviendo a aumentar para el tercero y último, mostrando la capacidad antioxidante más baja en el segundo tiempo (58 días de cultivo).

7.3.3 DPPH

Tabla 5 Capacidad Antioxidante por el método DPPH en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
DPPH	48 días	282.21 ± 8.2 ^a	356.54 ± 14.6 ^{a*}

mg Ác.	58 días	226.56 ± 5.5 ^b	293.98 ± 6.3 ^{b*}
Ascórbico/100 g	76 días	244.78 ± 2.0 ^b	401.43 ± 0.5 ^{a*}
de materia seca	Grano	53.37 ± 13.9	153.9 ± 10.0 [*]

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando la misma columna y contrastando el tiempo.

Los resultados arrojados en la prueba de medición de Capacidad Antioxidante por el método de DPPH, muestran una mayor capacidad antioxidante en todas las muestras de hoja y grano de amaranto del cultivo a Campo Abierto en un 20.8%, 22.9%, 39% y 65.3% respectivamente. Pero, mientras que los valores de capacidad antioxidante en muestras de hoja para el cultivo en invernadero se mantuvieron estables a lo largo del tiempo, los valores para el cultivo a campo abierto mostraron variaciones, disminuyendo la capacidad antioxidante del primer al segundo tiempo de muestreo en un 17.5%, siendo en este último en el que se observa la menor capacidad antioxidante (58 días de cultivo), aumentando en el tercer muestreo alcanzando la mayor capacidad antioxidante hasta en un 26.7% más que la anterior (76 días de cultivo).

Los métodos FRAP y DPPH son complementarios a un cierto grado. Ambos métodos se recomiendan como fáciles, rápidos, reproducibles y de bajo costo para la medición de la actividad antioxidante en los extractos de alimentos (Chlopicka et al., 2012).

Pasko et al. (2007) sugiere que la falta de correlación entre los métodos de determinación de Capacidad Antioxidante puede deberse a las diferencias entre los detalles de los métodos de estimación. En un estudio que realizó en brotes de amaranto y quinua en luz y sombra, en el cultivo a la luz del día, observó correlación: FRAP vs DPPH ($r = 0,96$), ABTS vs DPPH ($r = 0,92$) y FRAP vs ABTS ($r = 0,95$). En el cultivo en oscuridad se observaron las siguientes correlaciones DPPH vs ABTS ($r = 0,91$), FRAP vs DPPH ($r = 0,92$). Los resultados de contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante en semillas de cereales, mostraron en dicho estudio que el contenido total de polifenoles aumentó la actividad antioxidante en las semillas y observaron una fuerte correlación ($r=0.98$) entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante. Pasko et al. (2009) sugieren

que el contenido de fenoles totales es un buen predictor in vitro de la actividad antioxidante. Sus resultados demostraron que las semillas y brotes de cereales muestran actividad antioxidante relativamente alta. Los brotes tienen una actividad antioxidante significativamente mayor que las semillas, que puede ser un resultado de la diferencia en el contenido de polifenoles, antocianinas y otros compuestos.

7.4 Compuestos Fenólicos Totales

Tabla 6 Contenido de Compuestos Fenólicos Totales en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
CFT	48 días	1311.70 ± 9.6 ^a	2279.95 ± 89.0 ^{a*}
mg Eq Ác.	58 días	1621.04 ± 93.5 ^b	2656.87 ± 66.0 ^{b*}
Gálico/100 g de materia seca	76 días	1405.03 ± 48.9 ^a	2238.27 ± 51.6 ^{a*}
	Grano	5.47 ± 2.1	27.36 ± 5.3 [*]

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa (p<0.05) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) comparando la misma columna y contrastando el tiempo.

Se mostraron variaciones en el contenido de Compuestos Fenólicos en ambos métodos de cultivo a lo largo del tiempo. Mientras que la comparación de las muestras en los dos métodos de cultivo, la cantidad de Compuestos Fenólicos Totales fue superior en el cultivo en campo abierto en las tres muestras de hoja de amaranto en un 43.5%, 42.4% y 37.2% para el primer, segundo y tercer tiempo respectivamente, y en un 80% en el caso de la muestra del grano. Los valores obtenidos muestran poca variación en las muestras de hoja a lo largo del tiempo, sin embargo sí se observa una mayor cantidad de Compuestos Fenólicos en la muestra del segundo tiempo en ambos métodos de cultivo. Pasko (2007) en su estudio sobre cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante de semillas y brotes de amaranto y quinoa durante su crecimiento, observó que el contenido de polifenoles fue mayor en los brotes cultivados a la luz que en la oscuridad, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el caso Hofland-Zijlstra (2009) en su estudio sobre el efecto de la luz en la oferta de nutrimentos en ecosistemas de Brezales, encontró que las plantas que crecen bajo condiciones de sombra producen notablemente menor cantidad de compuestos

fenólicos que los que crecen a la luz plena. Ambos casos comentan resultados similares a los obtenidos en este estudio.

En este caso se observó una relación clara entre la Capacidad Antioxidante y los Compuestos Fenólicos Totales para las semillas de amaranto o extractos de hojas; lo que indica que los compuestos fenólicos son unos de los componentes en los extractos que presentan actividad antioxidante. Hay autores que indican que la Capacidad Antioxidante puede estar relacionada, además de los compuestos fenólicos, a otros compuestos como los aminoácidos, péptidos o escualeno (Gamel et al., 2007; Gorinstein et al., 2007; Rivera et al., 2010; Rodas and Bressani, 2009; Tironi and Añón, 2010). Otros compuestos antioxidantes presentes en los extractos pueden ser vitaminas, ácidos grasos y otros derivados de lípidos (López-Mejía et al., 2014).

7.5 Antocianinas Totales

Tabla 7 Contenido de Antocianinas Totales en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
AT	48 días	896.02 ± 6.2 ^a	352.21 ± 21.9 ^{a*}
mg Eq AT/100g de material seca	58 días	818.26 ± 33.6 ^b	742.97 ± 12.3 ^{b*}
	76 días	708.80 ± 12.4 ^c	376.04 ± 18.8 ^{a*}
	Grano	40.94 ± 0.8	74.39 ± 1.6 [*]

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa (p<0.05) comparando invernadero vs campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) comparando la misma columna y contrastando el tiempo.

Las Antocianinas Totales en hoja de amaranto fueron superiores en el cultivo de Invernadero con un 60.7%, 9.2% y 46.9%, correspondientes al primer, segundo y tercer tiempo de muestreo. Mientras que el resultado en el grano fue superior para el campo abierto en un 44.9% lo que concuerda con los resultados de CFT. Hay una disminución en la cantidad de Antocianinas Totales a lo largo del tiempo en las muestras de hoja del cultivo en invernadero, las muestras del cultivo a campo abierto son parecidas en el primer y tercer tiempo, mientras que la muestra del segundo tiempo tiene la mayor cantidad de compuestos fenólicos, sin embargo,

todas las muestras de hoja del cultivo en invernadero tienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos.

La aparente variación en la concentración de Antocianinas Totales en las muestras de hoja de amaranto del cultivo a campo abierto, es similar a lo que se observó en dos estudios independientes (Mendoza, 2012) y (Villanueva et al., 2010), en muestras de la planta del maíz y la cáscara de camu-camu respectivamente, en diferentes estados de madurez. Mendoza (2012) detecta una reducción en la concentración de Antocianinas en la planta del maíz hasta en un 60 y 65% en la última parte su ciclo y, sugiere que la acumulación de antocianinas pudo haber aumentado en el grano durante este periodo. Algo parecido es lo que se observa en los resultados arrojados en este estudio en la concentración de Antocianinas Totales en el cultivo a Campo Abierto. Las antocianinas son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas que pertenecen al grupo fitoquímico de los fenoles, los cuales son responsables de pigmentar de forma natural a los tejidos que los producen. Después de la clorofila, probablemente las antocianinas son el grupo de pigmentos visibles al ojo humano más importante en las plantas, éstas pueden conferirle una coloración roja, violácea o azul a las hojas, raíces, las flores, los frutos, las semillas, los tallos y en conjunto, prácticamente a toda la planta, ubicándose principalmente en las partes superficiales de sus órganos, aunque algunas veces también se les encuentra internamente. La presencia de antocianinas en la superficie de la hoja y en el parénquima de empalizada puede reducir la captura de radiación, ayudando a la protección de los cloroplastos y reduciendo, en la medida de lo posible, la fotoinhibición y la fotooxidación (Mendoza, 2012).

Las antocianinas actúan como un sistema de protección contra la radiación ultravioleta (UV). Se sabe que con una absorbancia máxima de 260 nm el ADN es altamente vulnerable a los efectos de los rayos UV, por lo tanto, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos para disminuir la penetración de la radiación UV en el tejido vegetal, incluyendo entre éstos a la síntesis de compuestos fenólicos que la absorben (Ryan and Hunt, 2005). En muchas especies la biosíntesis de antocianinas es activada por la exposición a la radiación UV; en especial, las antocianinas aciladas pueden absorber la radiación UV biológicamente activa y se

ha sugerido que la función en los tejidos vegetativos puede ser para amortiguar el daño que ocasiona la radiación UV, al atenuar el exceso de energía (Li et al., 1993; Takahashi et al., 1991). También actúan como un sistema de captación de radicales libres, ya que la radiación intensa, aunada a la radiación UV, pueden incrementar la producción de radicales libres en las células de la planta. Se considera que para poder concluir si la síntesis y acumulación de antocianinas totales en muestras de hoja de amaranto es continua, se detiene o simplemente, que el cambio ocurrido en la intensidad del pigmento se debe a procesos de degradación de las antocianinas, ocasionado por la etapa fenológica final del cultivo, es necesario llevar a cabo estudios detallados de la cuantificación de las antocianinas totales a lo largo del tiempo de cultivo para ambos casos, ambiente protegido y campo abierto.

En un estudio reportaron que un aumento de las antocianinas en brotes de amaranto y quinuafue debido a los días de brote y al efecto de la luz. Los brotes que se habían criado con luz de día tenían un mayor contenido de antocianinas que los brotes que crecieron en la oscuridad. En general, las plantas que crecen con más oscuridad acumulan menos antocianinas en comparación a las plantas cultivadas a la luz, y este efecto es controlado por múltiples genes reguladores y se inducen por diversos factores, por ejemplo la luz (Taylor and Briggs, 1990). Dube, et al., (1992) mostraron que otros factores como el estrés iónico o factores ambientales (Sene et al., 2001) pueden inhibir la síntesis de antocianinas en el sorgo. Es importante llevar a cabo estudios adicionales para determinar qué factores ambientales influyen en el contenido de antocianinas de semillas y brotes de amaranto (Barton et al., 2009).

7.6 Taninos Condensados

Tabla 8 Contenido de Taninos en muestras de grano y hoja de amaranto.

Variable	Tiempo	Invernadero	Campo Abierto
Taninos	48 días	4611.61 ± 185.8 ^a	5426.03 ± 364.4 ^a
mg Eq	58 días	4229.68 ± 166.9 ^b	7106.21 ± 495.5 ^{b*}
Catequina/100 g	76 días	5442.81 ± 387.6 ^a	5243.19 ± 251.8 ^a
de materia seca	Grano	2242.68 ± 68.0	5366.06 ± 425.8*

Los resultados se muestran como el promedio de 3 determinaciones ± 1 DE. * Significa diferencia significativa (p<0.05) comparando invernadero vs campo abierto. Letras

diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando la misma columna y contrastando el tiempo.

El contenido de Taninos Condensados en las muestras analizadas, cambió en el segundo tiempo de muestreo de hoja de amaranto en ambos métodos de cultivo, pero fue superior la muestra de cultivo a Campo Abierto en un 40.4%, mientras que la muestra de grano del mismo método de cultivo fue superior en un 58.2% con respecto a la de invernadero. Las muestras de hoja del cultivo en invernadero son parecidas en el contenido de Taninos Condensados en el primer y tercer tiempo de muestreo, mientras que en el segundo tiempo se observa la menor cantidad. En el caso de las muestras de hoja en el cultivo a campo abierto, tienen una variación a lo largo del tiempo y se observa la mayor cantidad de Taninos en la muestra del segundo tiempo. Los factores anti-nutricios son sustancias naturales no fibrosas, generadas por el metabolismo secundario de las plantas como mecanismo de defensa a situaciones estresantes o contra el ataque de mohos, bacterias, insectos y aves, ejemplo de estos son los taninos, los cuales son sintetizados durante el desarrollo de la semilla y la planta las utiliza como fuente de aminoácidos aunque su principal función parece ser la defensa de la planta frente a hongos, insectos y nematodos. La denominación de “anti-nutricio” dada a estos compuestos, es adoptada a partir del enfoque que los ve como recursos alimenticios para animales y humanos y no de las funciones que cumplen en los tejidos de los vegetales que los contienen. Se han desarrollado un buen número de estudios en los que se revela que estos compuestos en pequeñas cantidades, pueden ser muy beneficiosos en la prevención de enfermedades; razón por la cual ahora se les ha denominado “compuestos no nutritivos”, o “factores nutricionalmente bioactivos”, ya que si bien carecen de valor nutrimental, no resultarían perjudiciales en pequeñas cantidades (Daffus and Slaughter, 1985). Los taninos condensados son los más predominantes en leguminosas y cereales (Sánchez et al., 2009). A partir de pruebas histoquímicas de vainillina-HCl se ha demostrado que los taninos están presentes sólo en la testa de variedades negras y pardas, y que el color está directamente relacionado con el contenido de compuestos fenólicos en la semilla. Las variedades negras y pardas, debido a su contenido de taninos, presentan testas de mayor grosor y dureza, posiblemente son menos permeables al agua y

más resistentes al ataque de patógenos, en comparación con las semillas de testa blanca (Morales et al., 2009).

Northup et al. (1995) sugiere que el dominio de las especies de plantas en ecosistemas pobres en nutrientes es el resultado de la producción de altos niveles de compuestos secundarios a base de carbono, por ejemplo, taninos. La concentración de fenoles totales y taninos condensados mostraron niveles más altos en las hojas de *C. vulgaris* cuando se cultivó en suelos pobres de humus, en comparación con suelos ricos en humus (Hofland-Zijlstra and Berendse, 2009).

Hansen et al. (2006), mostró que una combinación de adición de nitrógeno con un aumento de la temperatura del aire parece inducir una respuesta positiva de los taninos condensados en las hojas de un año de edad de *Vaccinium vitis-Idaeae* y *Cassiope tetragona*, pero no tuvo ningún efecto detectable sobre los niveles de taninos en un ambiente sombreado. Hofland-Zijlstra et al. (2009) en su estudio sobre la oferta de nutrientes y la intensidad de luz en ecosistemas brezales, concluye que hay mucha variación natural en fenoles totales y de taninos condensados dentro y entre las plantas ericáceas y que esto depende en gran medida de las características del lugar (luz, nutrientes del suelo) y especies de plantas, lo que puede justificar los resultados variables en este estudio de acuerdo al tiempo y la exposición a la luz, pero obtuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos y taninos condensados en las plantas que crecieron a la luz que las de sombra.

VIII CONCLUSIONES

La cantidad de Ácido Fítico en *Amaranthus hypochondriacus* se mantuvo constante a lo largo del ciclo de vida de la planta, siendo un poco mayor en las muestras de hoja de amaranto cultivado en invernadero. Con respecto a la muestra de grano de amaranto, la cantidad de Ácido Fítico en ésta es ligeramente mayor en la proveniente del cultivo a campo abierto. Aún con estas variaciones, es notable su estabilidad a lo largo del tiempo y los resultados en ambos métodos de cultivo se encuentran en el rango normal que reporta la bibliografía, por lo que se podría pensar que el contenido de Ácido Fítico se trata de una cualidad constante de la planta.

La cantidad de Tripsina Pura Inhibida en *Amaranthus hypochondriacus* se mantiene estable a lo largo del tiempo en ambos métodos de cultivo en las muestras de hoja de amaranto, siendo ligeramente mayor en las muestras de cultivo a campo abierto, sin embargo, aquí también se podría pensar que se trata de otra cualidad que permanece constante a lo largo del tiempo ya que no se muestran variaciones en la cantidad. En el caso de las muestras del grano, la cantidad de Tripsina Pura Inhibida es mayor en la muestra del campo abierto en un 80.3%.

De acuerdo con las tres pruebas de medición de Capacidad Antioxidante en hoja y grano de *Amaranthus hypochondriacus*, (Antioxidant Assay Kit, FRAP y DPPH) las muestras del campo abierto tienen mejores resultados en la captación de radicales libres.

La cantidad de Compuestos Fenólicos Totales de *Amaranthus hypochondriacus* fue superior en las muestras de hoja y grano de amaranto del cultivo en campo abierto. La cantidad de Antocianinas Totales de *Amaranthus hypochondriacus* se mantiene estable a lo largo del tiempo en las muestras del cultivo en invernadero, pero sufre variaciones a lo largo del ciclo de vida de la planta en el cultivo a campo abierto, teniendo el contenido más alto de este flavonoide a la mitad del ciclo de cultivo y disminuyendo en la última parte de éste, posiblemente por la etapa de la senescencia de la planta.

La cantidad de Taninos Condensados de *Amaranthus hypochondriacus* se mantiene estable a lo largo del tiempo en ambos métodos de cultivo pero ésta es mayor en las muestras de grano y hoja del cultivo a campo abierto.

En este estudio se pudo observar que tanto la capacidad antioxidante así como la producción de compuestos antioxidantes fue mayor en los cultivos en campo abierto. Si bien es cierto que el cultivo en invernadero ofrece numerosas ventajas desde el punto de vista del ambiente térmico, del rendimiento y de las condiciones de confort para la planta, esto resultó en una desventaja frente a los cultivos a campo abierto. Lo anterior origina la búsqueda de elicitores que puedan ser aplicados dentro del invernadero con el objetivo de promover la producción de antioxidantes, como compuestos secundarios de las plantas.

Este trabajo abre un camino en la línea de investigación que mide las propiedades del amaranto en sus diferentes métodos de cultivo, aporta información relevante para la industria alimentaria, antecedentes para la investigación, bases científicas para las organizaciones e instituciones públicas que llevan a cabo un arduo trabajo en promover el consumo del amaranto para que sea adoptado nuevamente por la población mexicana. Así se asegura la demanda por parte de la población y a su vez la oferta proveniente de la producción nacional, garantizando de esta manera la disponibilidad de nuevos alimentos y diversificando la dieta para un mejor aporte nutrimental de la misma.

Aunado a esto, es necesario llevar a cabo más investigaciones que midan las variables estudiadas en este trabajo con muestras que se obtengan en un menor rango de tiempo de separación entre una y otra, para tener un panorama más amplio de las variaciones que presentan las muestras de hoja y grano de amaranto en el contenido de cada variable.

IX REFERENCIAS

2010. Amaranthus. Department of Agriculture Forestry and Fisheries. Online.
- Barton, H., P. Pasko, P. Zagrodski, S. Gorinstein, M. Folta, and Z. Zachwieja. 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry* 115:994-998.
- Becerra, R. 2000. El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. *CONABIO. Biodiversitas*. 30:1-6.
- Becker, R., E. Wheeler, K. Lorenz, A. Stafford, O. Grosjean, and A. Betschart. 1981. A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science* 46:1175-1180.
- Cabrera-Baeza, H. F. 2012. Efecto de sistema de siembra, a campo abierto y bajo invernadero, sobre la calidad nutrimental, producción de grano y variables fisiológicas de amaranto. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Calzetta, RA., JR. Aguerre, and C. Suárez. 2004. Drying characteristics of amaranth grain. *Journal of Food Engineering* 65:197-203.
- Chagaray, A. 2005. Estudio de factibilidad del cultivo del amaranto. Ministerio de Producción y Desarrollo, Gobierno de la Provincia Catamarca.
- Chaudhary, N., C. Shee, A. Islam, F. Ahmad, D. Yernool, P. Kumar, and A. Sharma. 2008. Purification and characterization of trypsin inhibitors from *Putranjivaxburghii* seeds. *Phytochemistry* 69:2120--2126.
- Chávez-Servín, J. L., T. García-Gasca, K. de la Torre-Carbot, A. Mercado-Luna, and M. Délano. 2012. Amaranto: al rescate de un alimento de los dioses. *NTHE, Publicación cuatrimestral editada por el CONCYTEQ Vol. 3 No. 4:24-30*.
- Chlopicka, J., P. Pasko, S. Gorinstein, A. Jedryas, and P. Zagrodski. 2012. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *Food Science and Technology* 46:548-555.
- Conconi, A., M. Smerdon, G. Howe, and C. Ryan. 1996. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 383:826-829.
- Curiel, M. 1994. Algunos dulces mexicanos: historia y tecnología. *Cuadernos de Nutrición* 17, núm. 4:37-44.
- Daffus, C. and C. Slaughter. 1985. *Las semillas y sus usos*. México: A.G.T..
- Dube, A., S. Bharti, and M. M. Laloraya. 1992. Inhibition of anthocyanin synthesis by cobaltous ion in the 1st internode of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany* 43:1379-1382.
- Egounlety, M. and O. C. Aworh. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine Max* Merr), cowpea (*vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotylomageocarpa* Harms). *J. Food Eng.* 56:249--254.
- Escalante, M. 2010. Rescate y revaloración del cultivo del amaranto. Fundación Grupo Produce Distrito Federal.
- Escalante-Semerena, R. I. and H. Catalán. 2008. Situación actual del sector agropecuario en México: perspectivas y retos. *Economía UNAM: Economía Informa*, No. 350 Disponible en www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/350/01escalante.pdf Online.
- Fidantsi, A. and G. Doxastakis. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 21:119-124.

- Franco, O., R. Santos, J. Batista, A. Mendes, M. Araú, R. Moneratt, M. Grossi-de-Sá, and S. Freitas. 2003. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitors on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* 63:343--349.
- Gamel, T., A. Mesallam, A. Damir, L. Shekib, and J. Linssen. 2007. Characterization of amaranth seed oils. *J. FoodLipid* 14:323-334.
- Gil, A. 2010. *Tratado de Nutrición*. 2a ed. Madrid, España.
- Gorinstein, S., O. J. Medina-Vargas, N. O. Jaramillo, I. Arnao-Sañas, A. L. Martínez-Ayala, P. Arancibia-Avila, F. Toledo, E. Katrich, and S. Trakhtenberg. 2007. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur. Food Res. Technol.* 225:321-328.
- Hansen, A., S. Jonnason, A. Michelson, and R. Julkunen-Tiitto. 2006. Long-term experimental warming, shading and nutrient addition affect the concentration of phenolic compounds in arctic-alpine deciduous and evergreen dwarf shrubs. *Oecol* 147:1--11.
- Hernández, C. J. and A. C. Escudero. 1993. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agro. Mesoamer.* 4:42--47.
- Hernández, R. and G. Herrerías. 1998. Amarantho: Historia y promesa. Tehuacán: Horizonte del tiempo Vol. 1: 529.
- Hofland-Zijlstra, J. and F. Berendse. 2009. The effect of nutrient supply and light intensity on tannins and mycorrhizal colonisation in Dutch heathland ecosystems. *Plant Ecol* 201:661-675.
- Hurrell, R., M. Juillerat, M. Reddy, S. Lynch, and S. Dassenko. 1992. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Clin. Nutr.* Vol. 56:573-578.
- Juan, R., J. Pastor, M. Alaiz, C. Megías, and J. Vioque. 2007. Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. Page 49 in .
- Jurado Renteria, R. 1998. Amarantho: su importancia en la alimentación en México. Facultad de Química/Universidad Nacional Autónoma de México.
- Li, J., L. Ou, R. Raba, and R. Amundson. 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*.
- Liener, I. and M. Kakade. 1980. Protease inhibitors, Toxic Constituents of Plant Food Stuffs. Page 7--71 in Academic Press, New York.
- López-Mejía, A., A. López-Malo, and E. Palou. 2014. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus* L.) seeds or leaves. Page 55 in .
- Lorenz, K. and M. Gross. 1984. Saccharides of amaranth. *Nutrition Reports International* 29:721-726.
- Mapes, C., F. Basurto, and R. Bye. 1997. Ethnobotany of quintonil: knowledge, use and management of edible greens *Amaranthus* spp. (*Amaranthaceae*) in the Sierra Norte de Puebla, México. *Economic Botany* 51, núm. 3:293-306.
- Mendoza, G. B. 2012. Las antocianinas del maíz. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Millán, J., A. Montoya, R. Gutiérrez, X. Peralez, and C. Reyes. 2012. Optimization of Extrusion Process for Producing High Antioxidant Instant Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*L.) Flour Using Response Surface Methodology. *Applied Mathematics*, 3:1516-1525.

- Molina, J. and L. Cordoba. 2006. Informe nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C., SOMEFI.
- Morales, J. C., N. Vazquez, and R. Bressani. 2009. El amaranto, características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricional. 1a ed. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Mujica-Sánchez, A. and M. Berti. 1997. El cultivo del amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización.
- Mustafa, A. F., P. Seguin, and B. Gelin. 2011. Chemical composition, dietary fibre, tannins and minerals of grain amaranth genotypes. *Int. J. FoodSci. Nutr.*
- Muzquiz, M. 2006. Factores no-nutritivos en fuentes proteicas de origen vegetal: su implicación en Nutrición y Salud (en línea). *Brazilian Journal of Food Technology* (Río de Janeiro, Brasil): Online. Available: <http://www.ital.sp.gov.br/bj/bj_old/brazilianjournal/ed_especial_b/cor-15.pdf>.
- Nagamatsu, Y., A. Blanco, J. Délano, and E. Pimental. 2004. Light intensity and activity of trypsin inhibitors in amaranth leaves and seeds. *Revista Fitotecnica Mexicana*, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Vol 27. No. 2:127-132.
- Northup, R., Z. Yu, R. Dalhgren, and K. Vogt. 1995. Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. *Nature* 377:227--229.
- Pasko, P., M. Zajewicz, S. Gorinstein, and Z. Zachwieja. 2007. Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta Chromatographia* 4:661-672.
- Porr, M. 2009. El amaranto: pequeñas semillas colosales.
- Riera, M. 2011. Estudio de la acción fuertemente quelante del ácido fítico como factor antinutricional en granos y su incidencia en la baja disponibilidad de minerales. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.
- Rivera, G., V. Bocanegra-García, and A. Monge. 2010. Traditional plants as source of functional foods, a review. *CyTA J. Food* 8 (2):159-167.
- Rodas, B. and R. Bressani. 2009. Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto. *Arch. Latinoam. Nutr.* 59 (1):82-87.
- Ryan, C. 1990. Proteinase Inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:425-429.
- Ryan, K. G. and J. E. Hunt. 2005. The effects of UV-B radiation on temperate southern hemisphere forests. *Environmental Pollution* 137:415-427.
- SAGARPA, S. 2014. Amaranto. SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Online.
- Sánchez, L., E. Madrigal, S. Fatel, S. Villa, and M. Valadez. 2009. Cuantificación de compuestos antinutricionales en semillas de amaranto de tres estados de la república y efecto citotóxico de extractos proteicos de amaranto del estado de Puebla. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Sene, M., T. Dore, and C. Gallet. 2001. Relationship between biomass and phenolic production in grain sorghum grown under different conditions. *Agronomy Journal* 93:49-54.
- Takahashi, A., K. Takeda, and T. Ohnishi. 1991. Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaureacyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiology* 32:541-547.

- Taylor, L. P. and W. R. Briggs. 1990. Genetic regulation and photocontrol and anthocyanin accumulation in maize seedlings. *The Plant Cell* 2:115-127.
- Teutonico, RA. and D. Knorr. 1985. Amaranth: composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology* 39:49-61.
- Tironi, V. A. and M. Añón. 2010. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: effect of proteolysis. *Food Res. Int.* 43:315-322.
- Trujillo, R. 1988. Investigaciones recientes sobre el amaranto. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Velasco, A. M. and D. Heyden. 1986. El uso y la representación del amaranto en la época prehispánica según las fuentes históricas y pictóricas. Page 8 in *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo.
- Viadel, M. B. 2002. Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos in vitro con cultivos celulares. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
- Villanueva, J., L. Condezo, and E. Asquiere. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciariadubia*(H.B.K) McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.
- Wang, C., S. Tsay, C. Lee, S. Liu, and N. Aras. 1992. Phytate content in Taiwanese diet determined by ³¹P. Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. s.l. : J. Agric. Food Chem.

ANEXOS

ANEXO 1. Ácido Fítico

Reactivos:

1. HCl 3.5% en agua desionizada.
2. NaCl cristal
3. Reactivo de Wade: 0.003% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + ácido sulfosalicílico 0.3%. Pesar 0.030 g (30 mg) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.3 g (300 mg) de ácido sulfosalicílico y aforar a 100 ml con agua desionizada. Forrar el frasco donde se guardará con papel aluminio.

Material y Método

1. Pesar 0.5 g de muestra molida malla 0.5 mm (si tiene alto contenido de grasa, la muestra debe ser desengrasada) en tubos Falcon de 14 ml o tubos para centrifugar de polipropileno de 25 ml.
2. Adicionar 10 ml de HCl 3.5% (usar agua desionizada para su preparación), agitar en vórtex por 5 seg.
3. Agitar las muestras a 220 rpm (velocidad en 5.5 del agitador) durante 1 h (también se propone dejarlo durante 16 h, sin embargo, los resultados son los mismos).
4. Centrifugar a 5000 rpm/20 min a 10°C.
5. Se extrae el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta y se coloca en un nuevo tubo Falcon de 14 ml o tubos para centrifuga de polipropileno de 25 ml, conteniendo 1 g de NaCl, agitar en vórtex por 5 seg.
6. Agitar a 350 rpm/20 min.
7. Colocar los tubos a -20°C/20 min (o a 4°C/60 min).
8. Centrifugar a 5000 rpm/20 min a 10°C.
9. 1 ml del sobrenadante claro se diluye 25 veces (esta D depende de la concentración de fitato de la muestra) en un tubo Falcon de 50 ml (1 ml + 24 ml de agua desionizada), se agita en vórtex por 5 seg.
10. A 3 ml de esta solución diluida se adiciona 1 ml del reactivo de Wade, se agita en vórtex por 5 seg.

11. Centrifugar a 5000 rpm/10 min a 10°C.
12. Tomar el sobrenadante de la superficie y leer a 500 nm contra un blanco de agua desionizada.
13. Extrapolar las absorbancias con la curva estándar para obtener los mg de fitato/ml. Posteriormente convertir a g considerando el peso de la muestra y las diluciones.

Curva estándar:

Se prepara una solución madre de fitato de sodio (Sigma, P-8810) a una concentración de 250 mcg/ml con agua destilada-desionizada, de la cual se toman diferentes volúmenes:

mcg fitato de sodio	mcl sol. Estándar	mcl de Agua destilada	ml de react de Wade
	0	3000	1
25	100	2900	1
50	200	2800	1
75	300	2700	1
100	400	2600	1
125	500	2500	1
150	600	2400	1
175	700	2300	1
200	800	2200	1
250	1000	2000	1
300	1200	1800	1

Con la ecuación de la curva se extrapolan las absorbancias de las muestras para obtener la concentración de ácido fítico en mcg fitato de sodio: $X = (Y - 0.5246) / (-0.0017)$. Luego para obtener los mg de fitato de sodio / g de muestra se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Mg fitato de sodio/g muestra} = \frac{\text{mcg fitato de sodio} \times 25 \times 10}{\text{g muestra} \times 3 \times 100}$$

Dónde:

25 = Dilución de la muestra

10 = ml de HCl iniciales

3 = ml de solución diluida de muestra en la reacción

1000 = conversión de mcg a mg de fitato de sodio

Referencias bibliográficas:

Maga, J.A. 1982. *J. Agric. Food Chem.* 30.1-9.

Cheryan, M. *Phytic acid interactions in food systems CRC: Critical Reviews in Food Sci. And Nutrition*, 1980, 297-335.

Kasim, A.B.; Edwards, H.M. *J. Sci. Food Agric.* 1998, 76, 1-9.

Concon, J. *Food toxicology*. Part A: principles and concepts. Marcel Dekker, Inc. USA, 1998, 411-416.

Carnovale, E.; Lugaro, E.; Lombardi-Boccia, G. *Cereal Chem.* 1988, 65, 11-117.

Gao Y, Shang C, SaghaiMaroof MA, Biyashev RM, Grabau EA, Kwanyuen P, Burton JW Buss GR. 2007. A Modified Colorimetric Method for Phytic Acid Analysis in Soybean. *Crop Science*, 47:1797-1803.

Vaintraub LA, Lapteva NA. 1988. Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of sedes and the products of their processing. *Analytical Biochemistry* 15:227-230.

ANEXO 2. Actividad Inhibitoria de Tripsina

Reactivos:

Buffer de Tris: TRIS 0.05M conteniendo CaCl_2 0.02M, pH 8.2. Pesar 6.05 g de tris (hidroximetilaminometano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 adicionando NaOH ó HCl 1M y 0.1M. Posteriormente aforar a 1L con agua destilada. Guardar en refrigeración (máximo 1 mes) y checar el pH cada que se emplee.

Solución de sustrato: Pesar 40 mg de BAPA o BAPNA (benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilidahidrocloruro) y disolver en 1 ml de dimetilsulfóxido y aforar a 100 ml con buffer de TRIS precalentado a 37°C.

NOTA: a esta temperatura es estable por 4 horas. Por lo que hay que preparar lo necesario antes de iniciar la reacción. Con el tiempo va tomando una coloración amarillenta.

Solución de Tripsina: Pesar 4 mg de tripsina pancreática (Fagbemi et al. 2005) en 200 ml de HCl 0.001 M (20 mcg tripsina/ml).

Nota: La solución dura aproximadamente 2 semanas a 4°C.

Extracción de la muestra: La muestra se muele a través de una malla de 0.50 mm. Cuando la muestra tiene una cantidad considerable de grasa se tiene que desgrasar (mayor a la de semilla de soya).

1. 1g de muestra molida se extrae con 50 ml de NaOH 0.01 N a pH 9.5-9.8. Ajustar con NaOH o HCl 1M o 0.1M.
2. Macerar continuamente con un homogeneizador por 2 min (Smith et al. 1980 propone otros 2 métodos de extracción; 1) 3 h con agitación, si no se dispersa macerar por 30 seg., y 2) Toda la noche en agitación a 4°C).
3. Centrifugar el extracto a 3600 rpm/15 min a 20°C.
4. Colectar el sobrenadante para ser diluido (si es necesario) a razón de que el extracto diluido tenga una actividad inhibitoria de la tripsina cerca del 50% (40-60%).

$$\% \text{ inhibición de tripsina} = ((\text{Std} - \text{Br}) - (\text{Mtra} - \text{Bmtra})) * 100 / (\text{Std} - \text{Br})$$

Dónde:

Std = Absorbancia del estándar de tripsina

Br = Absorbancia del blanco de reactivo

Mtra = Absorbancia de la muestra problema

Bmtra = Absorbancia del blanco de muestra

Recomendaciones:

MATERIAL VEGETAL	DILUCIÓN (D)
Semilla de soya	60
Semilla de soya extrudida	4
Pasta de soya	2.5 a 4
Pasta de ajonjolí	Sin diluir
Pasta de canola	Sin diluir, no es fácilmente detectable el inhibidor

La dilución se expresa en relación a los ml de extracto con respecto al volumen total diluido. Ej: D = 60 corresponde a 1 ml de extracto de la muestra diluido en 59 ml de agua destilada, dando un volumen total de 60 ml, por lo tanto $D = 1/60$.

Procedimiento:

Determinar la actividad de inhibición de la tripsina.

1. Colocar los tubos de ensaye de 10 ml perfectamente rotulados en una gradilla dentro de un baño maría a 37°C, siguiendo la siguiente metodología.

	Blanco reactivo	Estándar tripsina	Blanco de muestra	Muestra
Agua destilada (ml)	0.5	0.5	--	--
Muestra (ml)	--	--	0.5	0.5
BAPA a 37°C (ml)	1.25	1.25	1.25	1.25
Agitar en vórtex y mantener en incubación por 10 min a 37°C				
Tripsina a 37°C (ml)	--	0.5	--	0.5
Agitar en vórtex e incubar 10 min a 37°C				
Ácido acético 30% (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
Tripsina a 37°C (ml)	0.5	--	0.5	--
Agitar en vórtex y centrifugar				

2. Centrifugar a 12,000 rpm durante 12 min.
3. Leer a 385 nm contra un blanco de agua destilada (esta absorbancia se definió por un barrido previamente realizado).

4. Realizar cálculos:

$$\text{AIT} = (2.632 * D ((\text{Std} - \text{Br}) - (\text{Mtra} - \text{Bmtra}))) / \text{Peso de muestra}$$

Dónde:

AIT = Actividad inhibitoria de tripsina, mg de tripsina pura inhibida/g muestra

Referencias Bibliográficas

Liener IE, Kakade ML. 1969. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. ProteaseInhibitors. *Páginas 7-68*.

BELMAR, Roberto. Importancia de los factores antinutricionales en la alimentación de animales no rumiantes. En: Congreso de veterinaria. (10º: 2001: Trujillo) Memorias del X congreso de veterinaria. Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, 2001. P. 34-54.

BELMAR, Roberto y NAVA, Rutilo. Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos [en línea]. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán y Centro Regional Universitario Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Chapingo. [México: FMVZ-UADY y CRUPY-UACH]: 2000 [citado 17 mayo de 2007]. Disponible desde Internet URL: http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/roberto.htm

XOLIDO SYSTEMS. Muchos vegetales destinados a la alimentación pueden generar problemas de producción animal [en línea]. Xolido: portal xolido del sector primario y medio rural. [España]: Julio 31 de 2001 [citado 2 abril de 2008]. Disponible desde Internet URL: <http://www.xolido.com/?idarticulo=572>

Gil, A. (2010). Tratado de Nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Tomo II (2da. Ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

ANEXO 3. Antioxidant Assay Kit

Material Suministrado

No. Artículo	Artículo	Cantidad
10004872	Antioxidant Assay Buffer (10x)	1 vial
10004873	Antioxidant Assay Chromogen	3 vial
10004875	Antioxidant Assay Metmyoglobin	2 vial
10004876	Antioxidant Assay Trolox	3 vial
10004877	Antioxidant Assay Hydrogen Peroxide	1 vial
400014	96-Well Solid Plate (Colorimetric Assay)	1 plate
400012	96-Well Cover Sheet	1 cover

Material Necesario No Suministrado

1. Lector de placas de medición de absorbancia a 750 nm o 405 nm; *NOTA: La absorbancia puede ser leída a 405 nm, sin embargo, hay menos interferencia a 750 nm.*
2. Pipetas ajustables y pipetas de repetición.
3. Fuente de agua pura, vaso de agua destilada o HPLC.

Preparación del reactivo

Algunos componentes del kit están liofilizados (al vacío) o en forma concentrada y necesitan ser reconstituidos o diluidos antes de usarse

1. Antioxidant Assay Buffer (10x)

Diluir 3 ml de Assay Buffer con 27 ml de agua HPLC. Este Buffer diluido (5 mM de fosfato de potasio, pH 7.4 que contiene 0.9% de cloruro sódico y 0.1 % de glucosa) se debe utilizar para reconstituir la metmioglobina.

NOTA: el uso del Buffer en el resto de las instrucciones se refiere a "Diluted Buffer".

Cuando se almacena a 4°C es estable durante al menos seis meses.

2. Antioxidant Assay Chromogen

Este frasco contiene polvo liofilizado de ABTS. Reconstituir el Cromógeno añadiendo 6 ml de agua HPLC y revolver bien. Un vial reconstituido será suficiente para 40 pozos.

NOTA: reconstituir solo el número a usar para el ensayo o las muestras. El reactivo reconstituido es estable por 24 horas a 4°C.

3. Antioxidant Assay Metmyoglobin

Contienen metmioglobina liofilizada en polvo. Reconstituir la metmioglobina añadiendo 600 mcl de Assay Buffer y revolver bien. Un frasco reconstituido será suficiente para 60 pozos.

NOTA: el reactivo reconstituido es estable por un mes a -20°C.

4. Antioxidant Assay Trolox

Contiene polvo liofilizado de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Reconstituir el frasco de Trolox añadiendo 1 ml de agua HPLC y revolver bien. El reactivo reconstituido es usado para preparar la curva estándar de Trolox.

NOTA: el reactivo reconstituido es estable por 24 horas a 4°C.

5. Antioxidant Assay Hydrogen Peroxide

Contiene una solución de peróxido de hidrogeno 8.82M. Diluir 10mcl de peróxido de hidrogeno con 990 mcl de agua HPLC. Diluir aún más mediante la eliminación de 20 mcl y diluir con 3.98 ml de agua HPLC para dar una solución de trabajo de 441 mcl.

NOTA: la solución de trabajo de peróxido de hidrogeno es estable por 4 horas a temperatura ambiente.

Ensayo

1. Preparación del estándar de Trolox: 7 tubos de ensayo de vidrio limpios y marcarlos A – G. Agregar la cantidad reconstituida de Trolox y Assay Buffer para cada tubo como se describe en la tabla 1.

Tubo	Trolox (mcl)	Assay Buffer	Concentración
A	0	1000	0
B	30	970	0.045
C	60	970	0.090
D	90	910	0.135
E	120	880	0.18
F	150	850	0.225
G	220	780	0.330

2. TroloxEstand Wells:

Agregar 10 mcl de estándar (tubos A – G), 10 mcl de Metmioglobina, y 150 mcl de Cromógeno por pozo (determinados) en la placa.

3. Sample Wells:

Agregar 10 mcl de muestra, 10 mcl de Metmioglobina, y 150 mcl de Cromógeno a dos pozos. Para obtener resultados reproducibles, los niveles de antioxidantes de la muestra deben estar dentro de la curva estándar. Cuando sea necesario, las muestras pueden ser diluidas con Assay Buffer para llevar antioxidantes a este nivel.

4. Iniciar las reacciones añadiendo 40 mcl de Solución de Trabajo de Peróxido de Hidrogeno a todos los pozos utilizados. Agregar el Peróxido de Hidrógeno tan rápido como sea posible (dentro de un minuto es recomendable).
5. Cubrir la placa e incubar en Elisa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Retire la tapa y leer la absorbancia a 750 nm o 405 nm en el lector de placas.

Información General

- El volumen final es 210 mcl en todos los pozos.
- Todos los reactivos excepto dos muestras deben estar a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo.
- No es necesario usar todos los pozos de la placa al mismo tiempo.
- Si el nivel antioxidante de la muestra no es sabido o si se espera que esté más allá del rango de la curva, es prudente llevar la muestra a varias diluciones
- Se recomienda que la muestra y el Estándar de Trolox sean preparados al menos en duplicado (mejor triplicado).
- Supervisar la absorbancia a 750 nm o 405 nm usando un lector de placas.

Etanol o Dimetilsulfoxido (10 mcl) se pueden usar en el ensayo. Sin embargo, el solvente (10 mcl) necesita ser agregado a los pozos del estándar de Trolox para compensar la disminución de la absorbancia ejercido por el disolvente. El metanol interfiere con el cromógeno y no se puede añadir al ensayo.

Referencias bibliográficas

Zapata L, Gerard L, Davies C, Schwab M. Estudio de los componentes y actividad antioxidante en tomate. Ciencia, Docencia y Tecnología 2007. Año XVIII No 35 (173-193).

Murillo E. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de Té comercializadas en Costa Rica. Universidad de Panama/Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT) 2002.

Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo; el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Instituto de Cardiología y Cirugía cardiovascular, Enero 2000. Habana-Cuba.

Troncoso, Guija, Quiroz. Capacidad antioxidante del chimichurri y sus componentes. Segundo Congreso Internacional FITO 2003.

Neira A, Yuri J. El valor nutritivo de la Fruta. Boletín Técnico. PMACEAS. Universidad de Talca. 2004, Vol 4. No 4.

Díaz Llopis M, Palomares P, Amselem L, Romero J, García-Delpech S. ArchSocEspOftalmol. 2007 Jul; 82 (7): 397-8; autor reply 398-400.

ANEXO 4. FRAP

Objetivo

Valora la capacidad antioxidante mediante la técnica FRAP (poder antioxidante reductor del hierro).

Material

Reactivo o sustancia	Cantidad a utilizar
Acetato de Sodio	1.55 g
TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazine	0.156 g
Ácido clorhídrico	330 mcl
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.176 g
Ácido acético glacial	8 ml
Ácido ascórbico	.176 g
Agua HPLC	500 ml
Muestras a estudiar	0.01 g de cada muestra

Cantidad	Material
10	Tubos de ensaye
	Papel aluminio
	Papel parafilm
1	Micropipeta 20-200 µl
1	Micropipeta multicanal 30-300 µl
	Puntas para micropipetas
1	Agitador magnético (mosca)
	Charolas de plástico
8	Tubos de centrifuga(Falcon) de 50 ml con tapa
1	Placa plástico de 96 pozos
1	Vaso de precipitado de 100 ml
1	Vaso de precipitado de 50 ml
1	Plumón para marcar
2	Probetas de vidrio o plástico de 100 ml
	Pipeta de 20 ml
1	Gradilla
1	Matraz aforado de 100 ml

1	Matraz aforado de 500 ml
4	Embudos pesa sustancias de cristal
1	Espátula para pesar muestra
1	Recipiente ámbar de vidrio con tapa de 500 ml
1	Recipiente ámbar de vidrio con tapa de 100 ml
2	Recipientes ámbar de vidrio con tapa de 50 ml
	Muestras a analizar
	Equipo
	Espectrofotómetro ELISA
	Balanza Analítica
	Centrifuga
	Parrilla magnética y mosca
	Potenciómetro
	Vórtex

Procedimiento

- 1) Cubrir los 8 tubos de centrifuga (Falcon) con papel aluminio.
- 2) Cubrir los recipientes de vidrio para los reactivos con papel aluminio o utilizar recipientes ámbar de vidrio.

Preparación de los reactivos

- Buffer de Acetato: Pesar 1.55 g y en un matraz de 500 ml, disolver en una base de agua y agregar 8 ml de Ác. Acético glacial, ajustar a pH 3.6 y aforar.
- TPTZ: En una base de agua en un matraz de 100 ml, agregar 330 mcl de Ác. Clorhídrico y aforar. Tomar 50 ml de esta solución y agregar 0.156 g de TPTZ, agitar en vórtex para homogeneizar.
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Pesar 0.176 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y agregar 20 ml de agua HPLC
- Ácido ascórbico 10,000 mM Stock: Pesar 0.176 g de Ácido ascórbico y agregar 100 ml de agua HPLC.

Preparación de la muestra

- 3) Pesar .01 g de muestra y agregar 25 ml de agua HPLC a punto de ebullición, agitar a 800 rpm por 30 minutos para la extracción de la muestra.

- 4) Centrifugar la muestra por 5 minutos a 6000 rpm para limpiar el extracto.
- 5) Tomar el sobrenadante para el análisis

Cálculo

- Pasar los datos obtenidos de la placa del lector ELISA a Excel.
- Sacar promedio de los datos triplicados
- Realizar curva de dispersión lineal
- Obtener R

Referencias bibliográficas

Salas, J. (2005). Frutos secos, salud y culturas mediterráneas. Editorial Glosa. España. Pp. 337

Benzie, I. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 239. 70-76.

ANEXO 5. DPPH

Material y equipo

Cantidad	Material
2	Embudos de cristal para pesar DPPH y Ac. Ascórbico
2	Embudos de cristal para pesar muestra, o las que se requieran.
3	Espátulas para pesar muestras
2	Matraces de 100 ml forrados aluminio
2	Matraces de 10 ml forrados de aluminio, o los que se requieran.
2	Vasos precipitados 200 ml
1	Vasito de precipitado 50 ml o menos.
6	Viales para las concentraciones de ácido ascórbico forrados aluminio
1	Agitador magnético
2	Tubos para centrífuga (Falcon) de 50 ml forrados aluminio, o los que se requieran.
1	Vórtex
1	Parrilla agitadora sin temperatura
1	Placa para ELISA
1	Tapa de la placa, forrada de papel aluminio
	Micropipetas
	Puntas para las micropipetas
2	Minipipetas de plástico para aforar en matraces.
1	Marcador para rotular
1	Tape color amarillo
	Papel parafilm
	Gradilla para tubos falcon
	Equipo
	Espectrofotómetro ELISA
	Balanza Analítica
	Centrífuga

Reactivos

En el almacén del Laboratorio de Biología Molecular de la FCN:

Reactivo o sustancia	Cantidad a utilizar	Nota
----------------------	---------------------	------

Reactivo o sustancia	Cantidad a utilizar	Nota
DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	0.039 g	Pesar en balanza analítica en embudo de cristal, registrar peso en bitácora.
Ácido Ascórbico	0.017 g	Pesar en balanza analítica en embudo de cristal, registrar peso en bitácora.
Metanol	200 ml	Apartar en un vaso de precipitado. Varía la cantidad de metanol requerida ya que depende del número de muestras para aforar.
Muestras a estudiar	0.10 g	Pesar en balanza analítica en embudo de cristal, registrar peso en bitácora.
Agua HPLC	150 ml	Apartar en un vaso de precipitado

Procedimiento

Preparación de muestra.

NOTA: Todo el procedimiento debe llevarse a cabo con la luz apagada.

- Pesar (0.1g) de muestra en embudo pesa-sustancias de cristal en la balanza analítica con las luces apagadas del laboratorio de Biología molecular.
- En matraces de 10 ml previamente forrados de aluminio y rotulados agregar la muestra pesada y disolver con metanol con ayuda de las minipipetas de plástico. SIN LLEGAR AL AFORE.
- Pasar por vórtex por 30 min.
- Una vez pasado por vórtex, aforar con metanol los matraces de 10 ml con ayuda de las minipipetas de plástico.
- Una vez aforado vaciar el contenido de los matraces en los tubos falcon previamente rotulados.
- Meter los tubos falcon a la centrifuga 1000 rpm por 10 minutos.

Preparación de reactivos

DPPH:

- Pesar (0.039g) del reactivo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) en embudo de cristal en la balanza analítica con las luces apagadas del laboratorio de Biología molecular.

- En un matraz de 100 ml previamente forrado de aluminio y rotulado, agregar el reactivo pesado y disolver con Metanol con ayuda de las minipipetas de plástico. *NOTA: Sin llegar al afore.*
- Colocar un agitador magnético en el matraz y tapar con papel parafilm
- Poner el matraz en una parrilla a 500 rpm por 30 minutos. OJO: Vigilar que no se caiga.
- Transcurridos los 30 min. Aforar con Metanol con ayuda de las minipipetas de plástico.

Ácido ascórbico

- Pesar (0.0176g) de ácido ascórbico en embudo de cristal en la balanza analítica con las luces apagadas del laboratorio de Biología molecular.
- En un matraz de 100 ml previamente forrado de aluminio y rotulado, agregar el reactivo pesado y disolver con agua HPLC con ayuda de las minipipetas de plástico. SIN LLEGAR AL AFORE.
- Tapar el matraz con papel parafilm, y agitar por inversión 10 veces.
- Aforar con agua HPLC con ayuda de las micropipetas de plástico.

Realización de curva de calibración.

- En los viales forrados previamente de aluminio, rotular las siguientes concentraciones: C1 (8.8), C2 (17.6), C3 (44), C4 (88), C5 (132), C6 (176)
- Agregar las siguientes cantidades de la preparación de Ácido Ascórbico más agua HPLC para las siguientes concentraciones:

Concentración Ácido Ascorbicomcg/ml	Cantidad Ácido Ascórbico (µl)	Cantidad de Agua HPLC (µl)
C1 8.8	50	950
C2 17.6	100	900
C3 44	250	750
C4 88	500	500
C5 132	750	250
C6 176	1000	0

NOTA: Llenar de menor a mayor concentración para no cambiar punta y no tener rezagos.

Preparación y llenado de placa

- Verter en un vasito de precipitado reactivo preparado de DPPH.
- Tener listo un vaso de precipitado con Metanol
- Tener listo un vaso de precipitado con Agua HPLC
- Tener listos los tubos falcon de las muestras en una gradilla.
- Tener listos los viales con las concentraciones de ácido ascórbico.

NOTA: Los vasos de precipitado solo son usados para facilitar el pipeteo para el llenado de la placa.

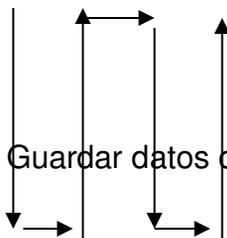
En oscuridad colocar en cada uno de los pozos lo que corresponde según la secuencia indicada en la siguiente tabla; Se recomienda llenar por triplicado y realizar el llenado hacia abajo para evitar sesgos por el tiempo de lectura.

NOTA: Tomar una placa por los costados para evitar dejar huellas en el área de lectura, en caso de limpiarla, hacerlo con algo suave (gasa o algodón).

	1	2	3	4
A	B	C4	C4	
B	B	C3	C4	
C	B	C3	C5	M2
D	Y	C3	C5	M2
E	Y	C2	C5	M2
F	Y	C2	C6	M1
G	C1	C2	C6	M1
H	C1	C1	C6	M1

Dónde:

B= Blanco (300 µl de metanol)
 Y= Blanco de muestra (300 µl de DPPH)
 C1-C6= Concentraciones de Ácido Ascórbico (20µl) + DPPH (280 µl)
 M= Muestra "M1 y M2 en caso que haya dos muestras diferentes" (20µl) de muestra + DPPH (280 µl)



Guardar datos de la lectura ELISA

Secuencia de lectura de ELISA Reposar placa tapada por 30 min. Y lectura a 517 nm



Figura3 Fotos del ensayo de DPPH en muestras de amaranto molido.

Lavado de placa:

- 1) Lavar con Agua corriente y Jabón neutro
- 2) Enjuagar con Agua corriente
- 3) Enjuagar con Agua destilada
- 4) Enjuagar con etanol y escurrir

Interpretación de resultados

- Pasar los datos obtenidos de la placa del lector ELISA a Excel.
- Sacar promedio de los datos triplicados
- Realizar curva de regresión lineal
- Sacar R

Referencias bibliográficas

Pablo Coba, Lee MayacuTivi y GeovanniVidari. 2010. "Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*".

Universidad Politécnica Salesiana. Ecuador. La Granja. 22:30 pp.

Dr. Castañeda C. B., Q.F. Ramos LL. E., Dra. Ibáñez V. L., 2008. "Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas".Revista Horizonte Médico. Volumen 8 No.1.

ANEXO 6. Compuestos Fenólicos

Material

Cantidad	Material
10	Tubos de ensaye
	Aluminio
1	Micropipeta 20-200 μ l
1	Micropipeta multicanal 30-300 μ l
	Puntas para micropipetas
1	Agitador magnético
	Charolas de plástico
	Tubos falcon de 50 ml con tapa
1	Placa plástico de 96 pozos
1	Espectrofotómetro
	Vasos de precipitado de 100 ml
1	Plumón para marcar
1	Vórtex
2	Probetas de vidrio o plástico de
1	Parrilla eléctrica
1	Gradilla

Reactivos

- Ácido gálico (2 mg/ml)
- Agua HPLC (90 ml aprox)
- Muestras a estudiar
- Reactivo de Folin
- Reactivo Na_2CO_3 (3.5 g)

Procedimiento

*NOTA: Todo el procedimiento se debe llevar a cabo con la luz apagada. *En el ANEXO 1 se observa un diagrama general de la técnica.*

Preparación de reactivo

- Ácido gálico: se pesan 50 mg de Ác. Gálico y se aforan a 25 ml de agua HPLC, se vierte en un tubo falcon envuelto en aluminio y se tapa.
- Carbonato de sodio Na_2CO_3 (7%): se pesan 3.5 g de Na_2CO_3 y se agregan 50 ml de agua HPLC, se coloca un agitador. Se coloca en una parrilla eléctrica hasta

su dilución a una agitación No.4, ya disuelto se retira y se envuelve en papel aluminio y se tapa.

- Reactivo de Folin.

Realización de curva de calibración

- a. Cubrir con papel aluminio y marcar los tubos de vidrio con cada una de las concentraciones señaladas en la 1^{er} columna de la tabla 1.
- b. Tomar primero la cantidad de agua HPLC y colocarla en el tubo correspondiente, posteriormente colocar la cantidad de ácido gálico. Repetir lo mismo para cada una de las concentraciones

Tabla 1. Diluciones de ácido gálico para curva de calibración.

Concentración (mg/ml)	Cantidad de ác. Gálico (µl)	Cantidad de agua HPLC (µl)
.20	250	2250
.18	225	2275
.16	200	2300
.14	175	2325
.12	150	2350
.10	125	2375
.08	100	2400
.06	75	2425
.04	50	2450
.02	25	2475

- c. Una vez terminados todos los tubos, se agitan uno por uno.

Preparación de la placa

Tomar una placa por los costados para evitar dejar huellas en el área de lectura, en caso de limpiarla, hacerlo con algo suave (gasa o algodón).

Llenado de la placa

En oscuridad colocar en cada uno de los pozos lo que corresponde según la secuencia indicada en la tabla 2. Se recomienda realizar cada llenado por triplicado y realizar el llenado hacia abajo* para evitar sesgos por el tiempo de lectura.

Tabla 2. Secuencia de llenado de la placa.

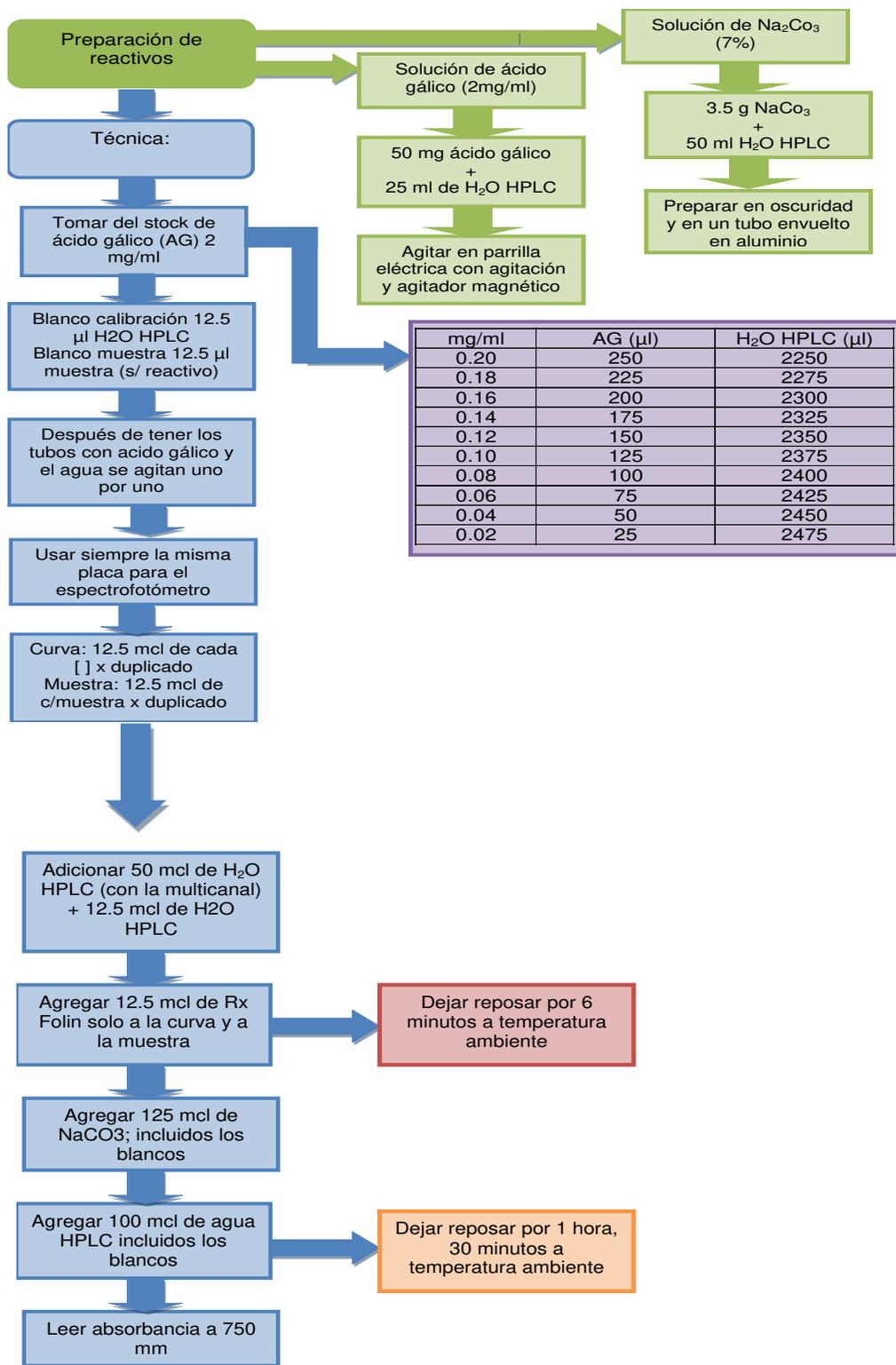
No.	REACTIVO O SUSTANCIA	BLANCO DE CALIBRACIÓN	BLANCO MUESTRA	CURVA	MUESTRA
1	12.5 µl de agua HPLC	X			
2	12.5 µl de muestra (sin reactivo)		X		
3	12.5 µl de cada concentración			X	
4	12.5 µl de cada muestra				X
5	50 µl de agua HPLC (multicanal)	X	X	X	X
6	13 µl de agua HPLC	X	X		
7	13 µl de reactivo Folin			X	X
Reposar 6 min a temperatura ambiente y tapada					
8	125 µl de Na ₂ CO ₃ (7%)	X	X	X	X
9	100 µl de agua HPLC	X	X	X	X
Reposar 1:30 h a temperatura ambiente y tapada					

*Se muestra un ejemplo de llenado de placa. Se recomienda realizar con anterioridad el esquema de placa que se realizará para asegurar y facilitar la secuencia establecida.

Lectura de absorbancia

Se debe programar el lector de ELISA a 750 nm de longitud de onda.

Diagrama de Flujo Compuestos Fenólicos Totales



Llenado de placa para determinación CFT

Fenoles Totales.

B=Bco calibración: 12.5µL agua HPLC

Yn = Bco.de muestra: 12.5µL de su Muestra respectiva

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	Y3										
B	B	Y3										
C	B	Y3										
D	B	Y3										
E	Y1	Y2										
F	Y1	Y2										
G	Y1	Y2										
H	Y1	Y2										

Cn (de 0.2 a 0.02) = Curva: 12.5µL de su concentración respectiva

Mn=Muestra: 12.5µL de su muestra respectiva

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			C.2	M2	M3							
B			C.18	M2	M3							
C			C.14	M2	M3							
D			C.12	M2	M3							
E			C.1	M1								
F			C.08	M1								
G			C.04	M1								
H			C.02	M1								

TODOS: 50µL agua HPLC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	Y3	C.2	M2	M3							
B	B	Y3	C.18	M2	M3							
C	B	Y3	C.14	M2	M3							
D	B	Y3	C.12	M2	M3							
E	Y1	Y2	C.1	M1								
F	Y1	Y2	C.08	M1								
G	Y1	Y2	C.04	M1								
H	Y1	Y2	C.02	M1								

B, Y1, Y2, Y3 = 13µL agua HPLC

Cn (de 0.2 a 0.02), M1, M2, M3 = 13µL Reactivo FOLIN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	Y3	C.2	M2	M3							
B	B	Y3	C.18	M2	M3							
C	B	Y3	C.14	M2	M3							
D	B	Y3	C.12	M2	M3							
E	Y1	Y2	C.1	M1								
F	Y1	Y2	C.08	M1								
G	Y1	Y2	C.04	M1								
H	Y1	Y2	C.02	M1								

TODOS: 125µL Reactivo Na2CO3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	Y3	C.2	M2	M3							
B	B	Y3	C.18	M2	M3							
C	B	Y3	C.14	M2	M3							
D	B	Y3	C.12	M2	M3							
E	Y1	Y2	C.1	M1								
F	Y1	Y2	C.08	M1								
G	Y1	Y2	C.04	M1								
H	Y1	Y2	C.02	M1								

Referencias bibliográficas

Thomas, M.J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, v. 16, n. 7-8, p. 716-718, 2000.

Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1523-1540, 1997.

Perón, J. M. R.; López, J.R.M.; López, Y.T. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, v. 30, n. 1, p. 15-20, 2001.

ANEXO 7. Antocianinas Totales

Reactivos

Reactivo o sustancia	Cantidad a utilizar	Código/marca
Ácido clorhídrico	15 ml aprox.	A1360-3.5/High Purity
Etanol	200 ml	9014-03/Baker
Agua HPLC	150 ml	Apartar en un vaso de precipitado
Muestras a estudiar	1 gr	-----

Material

Cantidad	Material y Equipo
1	Espectrofotómetro
1	Potenciómetro
1	Centrífuga
6	Matraces de 25 ml con tapa
12	Tubos de centrífuga (Falcon) de 25 ml con tapa
1 rollo	Papel aluminio
1 rollo	Papel parafilm
1	Balanza analítica con precisión de 0.1 mg
1	Parrilla magnética
1	Agitador magnético (mosca)
1	Espátula
6	Embudo pesa-sustancias de cristal para pesar
1	Pipeta de 10 ml
1	Probeta de 500 ml
1	Matraz bola de 2000 ml
2	Matraces de 1000 ml
2	Matraces de 200 ml
1	Marcador para rotular
1	Tape amarilla

Procedimiento

*En el ANEXO 3 se muestra un diagrama general del proceso.

Preparar material

- 1) Forrar los matraces con aluminio y etiquetarlos.
- 2) Forrar los tubos para centrífuga (Falcon) con aluminio.

Preparar reactivos

- 1) Preparar 1,600 ml de Etanol acidificado (Etanol:HCl 1N (85:15)) y agitar con mosca a 8000 rpm durante 30 minutos.
*1,600 ml = Etanol 85% 1,360 ml
HCl 1N 15% 240 ml
- 2) Para 300 ml de HCl 1N: En un matraz de 300 ml, vaciar primero 296.80 ml de agua HPLC y después vaciar lentamente 3.20 ml de HCl.
- 3) Para 200 ml de HCl 4N: En un matraz de 200 ml, vaciar primero 175.5 ml de HPLC y después vaciar lentamente 24.5 ml de HCl.
- 4) Agregar 240 ml de la solución de HCl a 1,360 ml de Etanol en un matraz de 2000 ml, cubrir con parafilm.
- 5) Agitar la solución a 8000 rpm por 30 minutos.
- 6) Vaciar la solución de Etanol acidificado en dos matraces de 1000 ml.
- 7) Guardar en refrigeración (4°C) el sobrante de Etanol acidificado.

Preparar la muestra

- 8) Agitar la muestra para homogeneizar.
- 9) Pesar 1 gr de muestra de amaranto en embudo pesa-sustancias de cristal, registrar los pesos, agregar la muestra a los matraces de 25 ml, enjuagar el embudo pesa-sustancias con metanol acidificado para recuperar toda la muestra sin llegar a la línea de aforo.

Nota: hacer la determinación por triplicado.

- 10) Tapar correctamente los matraces y agitar a 8000 rpm durante 30 minutos para la extracción de la muestra.
- 11) Aforar con etanol acidificado y agitar nuevamente para la homogeneización del extracto.
- 12) Ajustar el pH del extracto a 1.0 con HCl 4N en tubos falcon forrados con papel aluminio.
- 13) Centrifugar la solución a 5000 rpm durante 15 minutos.
- 14) Decantar el sobrenadante a otro tubo falcon forrado con papel aluminio y centrifugar nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos para maximizar la limpieza de la muestra.

15) Tomar una alícuota del sobrenadante. Leer la muestra a una absorbancia de 535 nm en el espectrofotómetro y registrar los datos.

Cálculo

$$C = \left(\frac{A}{\epsilon}\right) \times \left(\frac{Vol}{1000}\right) \times PM \times \left(\frac{1}{Peso\ de\ muestra}\right) \times 10^6$$

Dónde:

C = Concentración de antocianinas totales (mg/Kg)

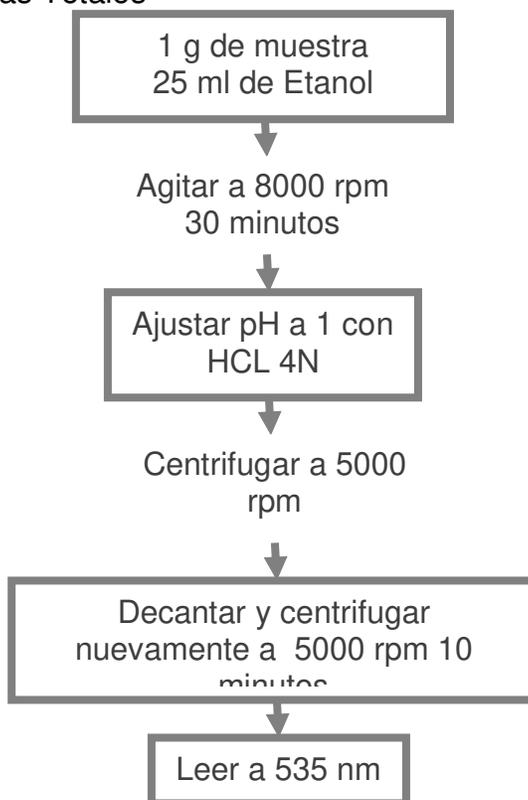
A = Absorbancia máxima

ϵ = Absortividad molar de cianidina-3-glucósido (25, 965 cm⁻¹M⁻¹L)

Vol = Volumen total del extracto de antocianinas

PM = Peso molecular de cianidina 3-glucósido (449.2gmol⁻¹)

Diagrama de flujo Antocianinas Totales



Referencias bibliográficas

Carla del Carpio Jiménez, Carlos Serrano Flores, Mónica Giusti. Caracterización de antocianinas de los frutos de Berberis boliviana Lechle. *Rev SocQuímPerú*. 75 (1) 2009

Ming, J.M., L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia, R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.

ANEXO 8. Taninos Condensados

Material y equipo

Cantidad	Material
10	Tubos de ensaye
	Aluminio
1	Micropipeta 20-200 μ l
1	Micropipeta multicanal 30-300 μ l
	Puntas para micropipetas
1	Agitador magnético
	Charolas de plástico
1	Tubo falcon de 50 ml con tapa
1	Placa plástico de 96 pozos
	Vasos de precipitado de 100 ml
1	Plumón para marcar
1	Vórtex
2	Probetas de vidrio o plástico de 50 ml
1	Parrilla eléctrica
1	Gradilla
	Algodón o gasa
1	Matraz de 10 ml
3	Matraz de 25 ml
1	Matraz de 50 ml
1	Embudo pesa-sustanciasde cristal
1	espátula
1	Mini pipeta de plástico
	Equipo
	Espectrofotómetro ELISA
	Balanza Analítica
	Centrifuga

Reactivos

Reactivo o sustancia	Cantidad a utilizar	Código/marca
Ácido clorhídrico	15 ml aprox.	A1360-3.5/High Purity
Metanol	200 ml	30900/Golden Bell
Vainillina	0.5 g	V2375-100 g/Sigma

(+) Catequina	25 mg	C1251-56/Sigma
Muestras a estudiar	240 µl cada muestra	_____

Procedimiento

NOTA: Todo el procedimiento se debe llevar a cabo con la luz apagada.

Preparación de muestra o del extracto.

- Pesar en un embudo pesa-sustancias de cristal 10 mg de muestra (0.010 g) en la balanza analítica del laboratorio de Biología Molecular.
- Bañar el embudo pesa-sustancias con metanol con ayuda de una mini pipeta de en un matraz de 10 ml. *NOTA: Sin llegar a la marca de afore.*
- Pasar por vórtex por 30 minutos
- Aforar en matraz de 10 ml con ayuda de la mini pipeta de plástico.
- Vaciar a 1 tubo falcon forrado en aluminio y centrifugar por 10 minutos 1000 rpm
NOTA: esto para cada muestra a realizar.

Preparación de reactivos

NOTA: Realizar bajo la campana de extracción.

$$V1C1=V2C2$$

* Ácido Clorhídrico HCl (8%): $(x)(100\%)=(25ml)(8\%)$
 $(25)(8)/100= 2ml$

* Ácido Clorhídrico HCl (4%): $(x)(100\%)=(25ml)(4\%)$
 $(25)(4)/100= 1ml$

- Ácido Clorhídrico HCL (8%): En un matraz de 25 ml agregar metanol y agregar 2 ml de HCl concentrado con ayuda de una pipeta volumétrica y aforar a 25 ml con metanol.
- Ácido Clorhídrico HCL (4%): En un matraz de 25 ml agregar metanol y agregar 1 ml de HCl concentrado con ayuda de una pipeta volumétrica y aforar a 25 ml con metanol.
- Vainillina (1%): Pesar 0.5 g de vainillina en una embudo pesa-sustancias de cristal en la balanza analítica y bañar con ayuda de mini pipeta de plástico aforando en un matraz de 50 ml con metanol.

- Catequina (+): Pesar 0.025 g de (+) catequina en una embudo pesa-sustancias de cristal en la balanza analítica y bañar con ayuda de mini pipeta de plástico aforando en un matraz de 25 ml con metanol (1 mg/ml).

Realización de curva de calibración

- Cubrir con papel aluminio y marcar los diez tubos de vidrio con cada una de las concentraciones señaladas en la 1^{er} columna de la tabla 1.
- Tomar primero la cantidad de metanol y colocarla en el tubo correspondiente, posteriormente colocar la cantidad de (+) catequina (como se indica en la tabla). Repetir lo mismo para cada una de las concentraciones.
- Pasar uno por uno por el vórtex 30 segundos.

NOTA: Para no cambiar punta, llenar de menor concentración a mayor.

Tabla 1. Diluciones de catequina para curva de calibración.

Concentración (mg/ml)	Cantidad de (+)catequina (µl)	Cantidad de metanol (µl)
C10= .20	500	2000
C9= .18	450	2050
C8= .16	400	2100
C7= .14	350	2150
C6= .12	300	2200
C5= .10	250	2250
C4= .08	200	2300
C3= .06	150	2350
C2= .04	100	2400
C1= .02	50	2450

Preparación y llenado de la placa

- Tener listo un vaso de precipitado con Metanol
- Tener listos los tubos falcon de las muestras en una gradilla.
- Tener listos los tubos de ensaye con las concentraciones de catequina
- Preparar una Solución 1:1 (6 ml de vainillina + 6 ml HCl 8%)

NOTA: Los vasos de precipitado solo son usados para facilitar el pipeteo para el llenado de la placa.

NOTA: Tomar una placa por los costados para evitar dejar huellas en el área de lectura, en caso de limpiarla, hacerlo con algo suave (gasa o algodón).

En oscuridad colocar en cada uno de los pozos lo que corresponde según la secuencia indicada en la siguiente tabla; Se recomienda llenar por triplicado y realizar el llenado hacia abajo para evitar sesgos por el tiempo de lectura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B	C4	C4	M1	M2				
B	B	C3	C5	M1	M2				
C	B	C3	C5	M1	M2				
D	Y1	C2	C6	C10					
E	Y1	C2	C6	C10					
F	Y1	C1	C7	C9					
G	Y2	C1	C7	C9					
H	Y2	Y2	C8	C8					

Dónde:

B= Blanco (40 µl de metanol)

Y= Blanco de muestra "Y1 y Y2 en caso que haya dos muestras diferentes" (40 µl del extracto)

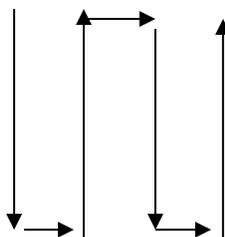
M= Blanco de muestra "M1 y M2 en caso que haya dos muestras diferentes" (40 µl del extracto)

C1-C10= Concentraciones Vainillina-Catequina (40 µl)

Agregar:

HCl 4% (200 µl) a B y Y

Solución 1:1 (200 µl) a C y M



Secuencia de lectura de ELISA reposar placa tapada por 20 min. Y lectura a 492 nm

Lavado de placa:

- 1) Lavar con Agua corriente y Jabón neutro
- 2) Enjuagar con Agua corriente
- 3) Enjuagar con Agua destilada
- 4) Enjuagar con etanol y escurrir

Referencias bibliográficas

Chlopika, J. (2012). Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *Food Science and Technology* 46.548-555.

Pasko, P. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry* 115.994–998.