



---

# TRABAJO FINAL DE CARRERA: TESINA DE GRADO

---

*TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (Amaranthus spp.) de interés biológico".*

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban. Legajo: UNRN-049.

Director: Dr. Barrio, Daniel Alejandro

Co- directora: Dra. Piñuel, María Lucrecia

**INDICE DE TABLAS:**

Tabla 1: Clasificación Botánica del Amaranto.....	9
Tabla 2: Líneas de amaranto seleccionadas.....	16
Tabla 3: Proteínas totales en las harinas de las líneas seleccionadas.....	22
Tabla 4: Contenido de lectinas en líneas seleccionadas.....	25

**INDICE DE FIGURAS:**

Figura 1.....	7
Figura 2.....	8
Figura 3.....	13
Figura 4.....	14
Figura 5.....	19
Figura 6.....	20
Figura 7.....	23
Figura 8.....	26
Figura 9.....	27

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## AGRADECIMIENTOS

*Un agradecimiento muy especial a mi director Lic. (Dr.) Daniel Alejandro Barrio y a mi co-directora (Dra.) María Lucrecia Piñuel por el tiempo dedicado, consejos y compromiso para la finalización de la tesina.*

*Al Lic. Sergio Eduardo Quichán por sus consejos, aportes y aliento constante.*

*A la Universidad Nacional de Río Negro que me dio la posibilidad de culminar con la carrera brindándome todos los recursos posibles.*

*A la Estación Experimental Valle Inferior INTA, en especial a los chicos de cereales que me dieron la posibilidad de realizar los respectivos ensayos.*

*Al director de la carrera Ing. Agr. Mario Villegas por su apoyo y ayuda ante cualquier consulta para la presentación del trabajo.*

*A mis amigos Mingardi Matías y Aranea Inti, por los buenos momentos compartidos.*

*A mis padres Víctor y Adriana, por su confianza y apoyo durante todo este tiempo transcurrido. A mis hermanos Vanesa y Rodrigo, por estar y acompañarme en lo que elija; y a Gisela por su paciencia y amor que me brinda junto a mi hija Valentina.*

Alumno: Cayuqueo Victor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

## RESUMEN

El amaranto es una alternativa productiva en el Valle Inferior del río Negro que produce alto contenido de proteínas con valor biológico. Entre las proteínas de reserva presentes en los granos de amaranto se han hallado hemoaglutininas (lectinas) con potenciales propiedades antitumorales. El objetivo general de esta tesina de grado fue seleccionar líneas de amaranto que presenten mayor contenido total de proteínas y en particular lectinas con actividad biológica. Para ello se cultivaron 9 líneas de amaranto producto del cruzamiento de *A. cruentus* con *A. hybridus* y fueron seleccionadas por características fenotípicas. Las semillas se cosecharon y se obtuvieron sus harinas. Por diferentes métodos estándares se determinó la composición nutricional de las harinas y se obtuvieron extractos proteicos para evaluar la actividad hemoaglutinante. Las proteínas extraídas fueron caracterizadas por electroforesis SDS-PAGE y el contenido de lectina fue determinado. Se seleccionaron las líneas 7, 9 y 10 con un contenido de lectina de 0,427, 0,273 y 0,262 mg lectina/mg de proteína soluble respectivamente. Se estimó el valor nutricional de estas líneas seleccionadas y se concluyó que nutricionalmente se asemejan a su parental *A. cruentus* ya que el contenido de lípidos está en el mismo orden y determina el valor energético. Finalmente, este trabajo contribuyó al conocimiento nutricional de las especies de amaranto cultivadas en la región norpatagónica y al valor biológico de las mismas.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

## INTRODUCCION

En el campo de la investigación de productos naturales con beneficios para la salud se ha tenido especial interés en plantas usadas por civilizaciones antiguas. Dentro de estas, las especies como *Amaranthus spp.* (Amaranto) han sido introducidas como cultivos alternativos en la zona de la Patagonia Norte.

El amaranto fue un cultivo de gran importancia en los pueblos precolombinos y la conquista española provocó casi su desaparición (Estrella, 1986). Este cultivo es uno de los más antiguos de América, con hallazgos arqueológicos de más de 6.000 años que junto con el maíz, la chía y la quinoa, fueron los principales granos utilizados en la alimentación de las culturas precolombinas. Incas, mayas y aztecas utilizaron el amaranto como su principal fuente de proteínas consumido como verdura y como cereal. Además, este cultivo fue el protagonista de diferentes ceremonias religiosas con el fin de adorar a distintos dioses (Kiez, 1992).

Luego con la llegada de los españoles la situación cambió, los cultivos fueron quemados, se prohibió y se impusieron castigos a quienes cultivaban o poseían esta semilla por considerarla "pagana". Esta situación, sumada a la sustitución de los cultivos autóctonos por foráneos, llevó a una disminución drástica del amaranto que logró prácticamente su erradicación (Estrella, 1986).

La difusión del cultivo en los últimos años ha sido exponencial en los diferentes países del mundo gracias a sus propiedades. En la actualidad se busca restituir su lugar como recurso de gran valor nutricional y como una alternativa productiva. Los principales productores de grano de amaranto son China, India, Kenia, México, Nepal, Perú, EE.UU. y Rusia.

Es una planta anual, herbácea o arbustiva de diversa morfología, de tallos suculentos cuando son tiernos y algo lignificados cuando están maduros, pueden medir hasta 3 metros de alto (Morros *et al.*, 1990; Tapia, 1997). La planta tiene por lo general un eje central bien diferenciado, pero hay algunas especies y variedades que tienden a ramificar a media altura o desde la base del tallo (Ejemplo: *Amaranthus palmeri*).

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

Las plantas son monoicas cuyas flores son pequeñas unisexuales, reunidas en glomérulos formando falsas umbelas con 3 o 5 brácteas externas cada una. Las flores masculinas con 3 o 5 estambres y las femeninas con un ovario supero en cuyo interior se forma una sola semilla. Un glomérulo en *Amaranthus*, con excepción de pocas especies es una ramificación dicasia que su primera flor es terminal y siempre masculina, en cuya base (en el pedúnculo) nacen 2 flores laterales femeninas las que a su vez serán terminales, cada una de las cuales origina otras dos flores laterales femeninas y así sucesivamente (Fig.1). Un glomérulo puede alcanzar hasta 250 flores femeninas, aunque el número de polinizadas es mucho menor, ya que la flor masculina luego de dejar libre el polen se seca y se cae.

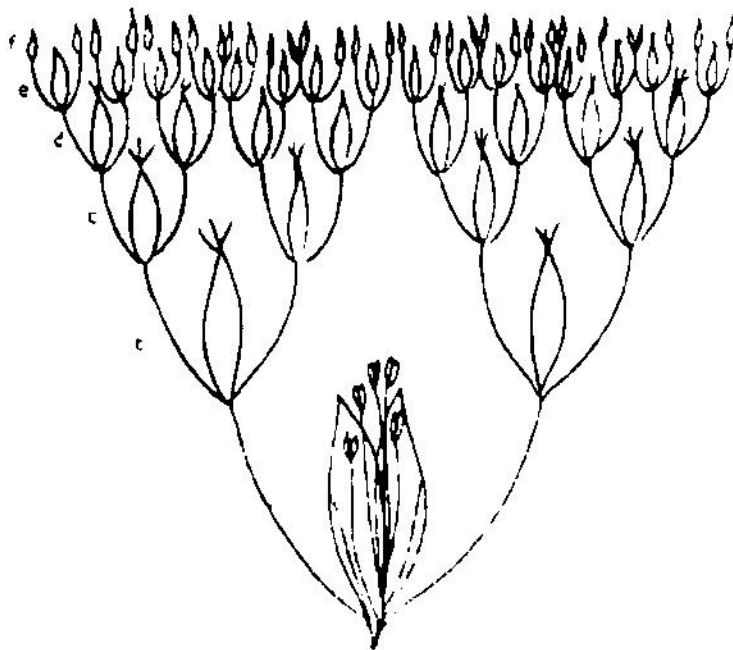


Figura 1: Representación esquemática de un glomérulo (cima dicasia): a: Flor masculina; b-f: Flores femeninas (Tomado de Saunders & Becker, 1984).

El fruto botánicamente es un pixidio unicolocular, es decir, una capsula, que cuando madura presenta una dehiscencia transversal dejando caer la parte superior llamada opérculo para dejar al descubierto la parte inferior llamada urna, donde se deposita la semilla (Fig. 2). La semilla es muy pequeña, mide entre 1

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

a 1,5 mm de diámetro y el número de semillas por gramo oscila entre 800 y 1000. Son de forma circular y de colores variados, se pueden encontrar granos blancos, blancos amarillentos, dorados, rosados, rojos o negros. Todas las especies silvestres (o malezas) presentan granos negros y de cubiertas muy duras. Anatómicamente en el grano se distinguen tres partes principales: la cubierta, que es una capa de células muy fina conocida como episperma; una segunda capa que está formada por los cotiledones que es la parte más rica en proteínas; y una capa interna, rica en almidones conocida como perisperma (Fig. 2).

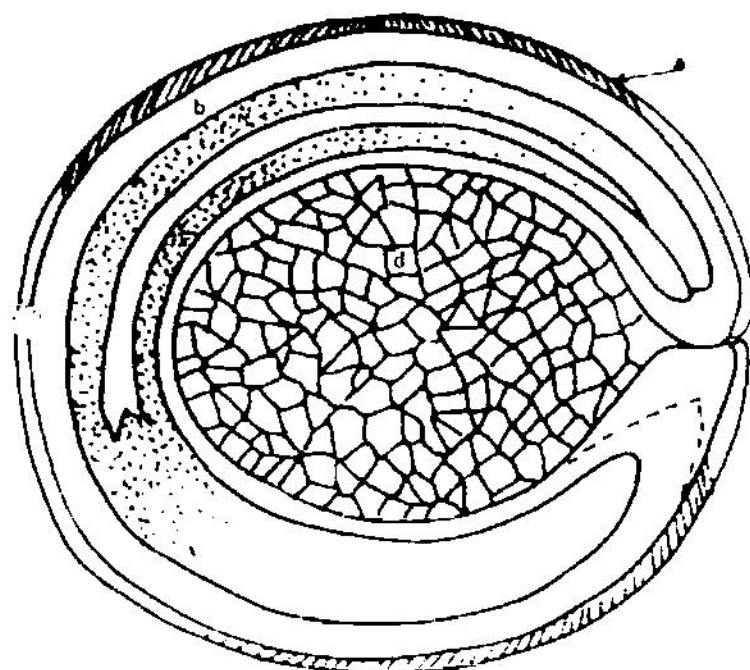


Figura 2: Semilla de amaranto (corte longitudinal); a Cubierta (episperma); b. Endosperma; c. Embrión (cotiledones); d. Perisperma "almidón" (Tomado de Saunders & Becker, 1984).

El género *Amaranthus* pertenece a la familia Amaranthaceae que incluye alrededor de 70 géneros y más de 800 especies. Algunas especies se mencionan en la Tabla 1. Del total de las especies, sólo unas pocas se emplean como cereales, muchas de las cuales son híbridos. Los amarantos productores

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

de grano también producen hojas comestibles antes de la madurez aunque no es frecuente el hallazgo de especies de doble propósito (Covas, 1994).

Tabla 1: Clasificación Botánica del Amaranto (Tomado de Dimitri & Parodi, 1980).

<b>CLASE</b>	Dicotiledónea		
<b>GRUPO</b>	Thalamiflorae		
<b>ORDEN</b>	Caryophyllales		
<b>FAMILIA</b>	Amaranthaceae		
<b>GENERO</b>	Amaranthus		
<b>ESPECIES (entre otras)</b>	<i>A. albus</i>	<i>A. anclalius</i>	<i>A. angustifolius</i>
	<i>A. atropurpureus</i>	<i>A. caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>
	<i>A. dubius</i>	<i>A. hybridus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
	<i>A. palmeri</i>	<i>A. spinosus</i>	<i>A. tricolor</i>

Dentro de las especies indicadas en la Tabla 1, las más difundidas a nivel mundial son *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. tricolor*. Las tres primeras son usadas con propósito granífero, mientras *A. tricolor* L. es empleado como vegetal junto a *A. dubius* y *A. lividus*. Las especies que se encuadran como malezas son *A. viridis*, *A. retroflexus* y *A. hybridus*.

El amaranto es resistente a sequías, crece en tierras poco fértiles, posee gran tolerancia a plagas y el contenido de proteínas del grano es de 12 a 18% con un alto valor biológico (Segura-Nieto *et al.*, 1994). Según el Código Alimentario Argentino, se entiende por amaranto a las semillas sanas, limpias y bien conservadas de varias especies.

El rango de adaptación para el amaranto va desde el nivel del mar hasta los 2800 metros de altitud, sin embargo, las especies que mejor comportamiento presentan a altitudes superiores a los 1000 metros son *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus quitensis* (*A. hybridus* L.). En general, las especies crecen mejor cuando la temperatura promedio no es inferior a 15°C y temperaturas de 18 a 24°C parecen ser las óptimas para el cultivo.

Las plantas de amaranto se determinan como parcialmente autogamas sin embargo, presentan entre un 10 y un 40% de alogamia dependiendo de varios factores como: la presencia de vientos e insectos, de la cantidad de polen producido y de la duración de la viabilidad del polen. Cuando dos o más especies

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".



de *Amaranthus* crecen juntos se producen hibridaciones interespecíficas. Los híbridos en su mayoría presentan anomalías como: mortalidad de plántulas, deformación del follaje como también de las flores y además puede haber esterilidad masculina o femenina. En estudios anteriores han demostrado que la hibridación entre algunas especies de amaranto puede ser una ruta para la adquisición de resistencia a diversos herbicidas (Wetzel *et al.*, 1999; Franssen *et al.*, 2001; Tranel *et al.*, 2002).

La semilla de amaranto es una importante fuente de proteínas no convencional y la Academia Nacional de Ciencias ha declarado que el amaranto podría ser un grano con potencial explotación comercial debido a su calidad nutricional (National Academy of Sciences, 1984). A su vez, el grano no posee gluten resultando un alimento apto para celíacos. Como hortaliza se consumen sus hojas, las que poseen un alto contenido en calcio, hierro, magnesio, fósforo y vitamina A y C, y se recomienda comerlas tiernas y cocidas. Posee un alto contenido de proteínas, como se mencionó con anterioridad que va desde el 12 hasta el 18%, superior al de la mayor parte de los cereales. Su composición de aminoácidos esenciales es cercana al equilibrio de aminoácidos óptimo requerido en la dieta humana (Schnetzler & Breen, 1994). Por su composición, la proteína del amaranto es similar a la de la leche y se aproxima a la proteína ideal propuesta por la FAO para la alimentación humana. Tiene un contenido importante de lisina, aminoácido comúnmente limitante en otros cereales. El hallazgo de péptidos bioactivos en las proteínas de estos granos sugiere un potencial uso para el desarrollo de alimentos nutritivos con propiedades funcionales. Recientemente, se han descrito péptidos bioactivos derivados de las proteínas de amaranto con actividades biológicas tales como antimicrobianos; antioxidante y antihipertensiva (Lipkin *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2011; Orsini *et al.*, 2011; Caselato-Sousa & Amaya-Farfán, 2012; Quiroga *et al.*, 2012). El grupo de trabajo de alimentos funcionales de la Sede Atlántica de la UNRN ha descrito previamente actividad antitumoral de aislados proteicos de *Amaranthus mantegazzianus* (Barrio & Añón, 2010) y en un trabajo posterior se aisló, purificó e identificó una lectina de la misma variedad de amaranto responsable de la actividad antitumoral (Quiroga *et al.*, 2014).

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular, aglutinan células y precipitan glicoconjugados. Se sabe, que las lectinas juegan un papel importante en el mecanismo de defensa de las plantas contra el ataque de microorganismos e insectos. Estas proteínas también son consideradas de almacenamiento y participan en la extensión de la pared celular y el transporte de carbohidratos (Abdullaev & Gonzalez de Mejia, 1997). La interacción específica entre lectinas y carbohidratos juega un rol crucial en investigaciones asociadas a los antígenos de los grupos de la sangre ABO. Dada la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, poseen efectos inmunosupresores, otras son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Existen también, numerosos trabajos que demuestran que las hemoaglutininas de plantas, tienen actividad antitumoral (inhibición del crecimiento tumoral) y actividad anti carcinogénica (inhibición de la inducción de cáncer por agentes cancerígenos) (Abdullaev & González de Mejía, 1997; Kwan & Bun, 2011). La particularidad de estas glicoproteínas es que son capaces de distinguir entre células normales y malignas por el perfil de glicosilación en la superficie celular. Durante varias décadas, las lectinas de plantas fueron consideradas sustancias tóxicas para las células y los animales, sin embargo, estudios recientes han demostrado que poseen un efecto inhibitor en el desarrollo del cáncer y hay una tendencia actual en la utilización de lectinas vegetales en la lucha contra éste (Liu *et al.*, 2010). Dada su importancia biotecnológica se ha descrito la producción de lectinas recombinantes pero se han obtenidos bajos rendimientos a un alto costo (Kwan & Bun, 2011). En este sentido, la producción de lectinas como herramienta biotecnológica se basa en el aislamiento cromatográfico desde fuente vegetales con alto contenido proteico como, por ejemplo, el amaranto.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## HIPOTESIS

A partir de las líneas de amaranto obtenidas del cruzamiento entre una especie productiva con alto contenido de proteínas (*Amaranthus cruentus* cultivar Mexicano) y una especie que presenta tolerancia frente a los ataques de insectos y al déficit de agua (*Amaranthus hybridus*), será posible seleccionar líneas productivas con alto contenido de proteínas totales y en particular de lectinas.

## OBJETIVO GENERAL

Seleccionar líneas de amaranto que presenten mayor contenido total de proteínas y en particular lectinas con actividad hemoaglutinante.

### **Objetivos específicos**

- *Evaluar el contenido de proteínas totales y de lectinas en diferentes líneas de amaranto.*
- *Seleccionar las líneas con mayor contenido de proteínas y actividad hemoaglutinante.*
- *Determinar la composición nutricional de las líneas seleccionadas.*

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

## METODOLOGIA

En este trabajo se seleccionaron líneas de amaranto dentro de una población abierta (conjunto de líneas de amaranto) producto de un cruzamiento no dirigido entre *Amaranthus cruentus* cultivar Mexicano y *Amaranthus hybridus* (L. Kunt). Este cruzamiento dio como resultado una nueva población de especies *Amaranthus* (F1). Se seleccionaron 9 líneas por sus características fenotípicas (color de panojas, porte de la planta, cantidad de semillas en la panoja, color de semilla). Estas líneas seleccionadas fueron nuevamente sembradas ese año en las mismas condiciones edáficas y ambientales. La F2 obtenida fue nuevamente seleccionada utilizando las mismas características fenotípicas. Se obtuvieron 9 líneas a las cuales se les realizaron análisis químicos y bioquímicos (Fig. 3).

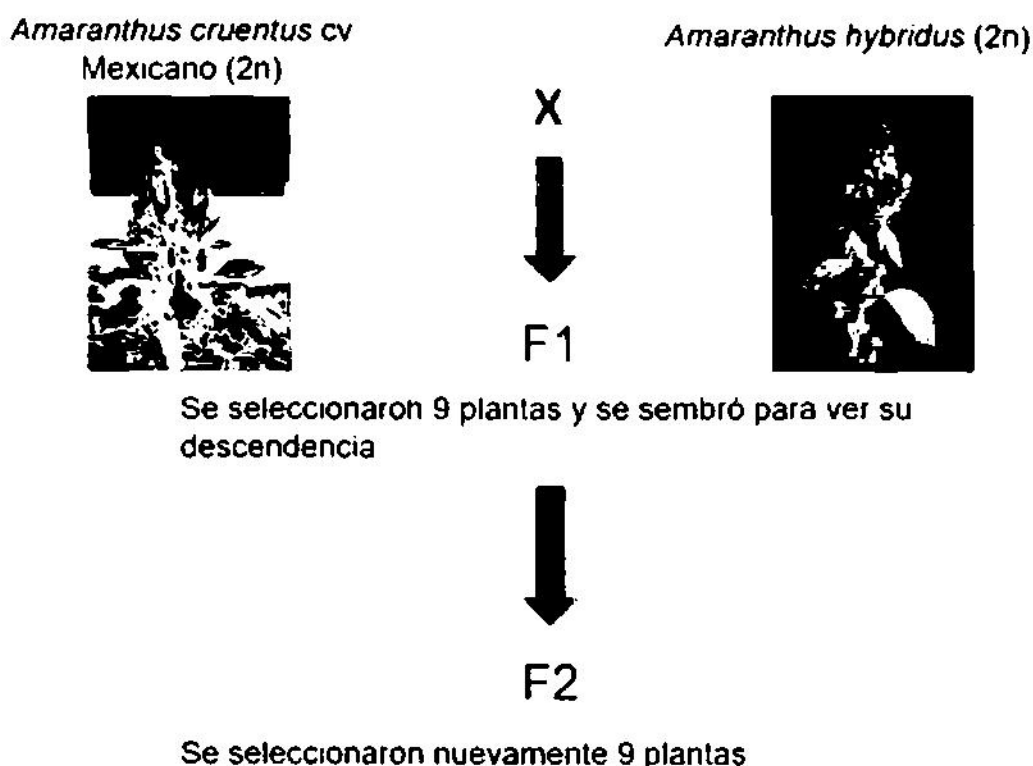


Figura 3: Esquema representativo desde el cruzamiento (*A. cruentus* x *A. hybridus*) hasta la selección de las líneas estudiadas.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

## 1. Área y manejo del cultivo

El área donde se llevó a cabo la producción de las líneas de amaranto está ubicada en el departamento Adolfo Alsina dentro de la Estación Experimental Valle Inferior INTA, cuya posición geográfica es: Latitud: 40° 47' 46. 86" S; Longitud: 63° 3' 23. 12" O (Fig. 4). El valle tiene como precipitación media 391 mm/año.

El ensayo se sembró en un suelo con las siguientes características fisicoquímicas (30 cm superiores): textura arcillosa; pH: 7,7 sobre pasta saturada; 3,2 % de materia orgánica, 0,26 % de nitrógeno y conductividad eléctrica de 0,58 mS/cm. En el manejo del cultivo se realizaron las labores culturales propias de la preparación para los cultivos de verano, para ello se pasó dos veces una rastra doble pesada y luego un cuadrante para emparejar el suelo. La siembra se realizó en parcelas de 5 metros de largo distanciados a 0,7 metros. Se emplearon aproximadamente 100 semillas por metro lineal, se tapó y compactó levemente con rastrillo a una profundidad de siembra no superior a 2 cm. A los 25 días de la emergencia se efectuaron los raleos necesarios para ajustar la densidad de plantas a 12,5 plantas por metro cuadrado. La parcela fue mantenida libre de malezas manualmente y se fertilizó con 90 kilogramos por hectárea de urea granulada y la totalidad de riegos gravitacionales empleados fueron 6.

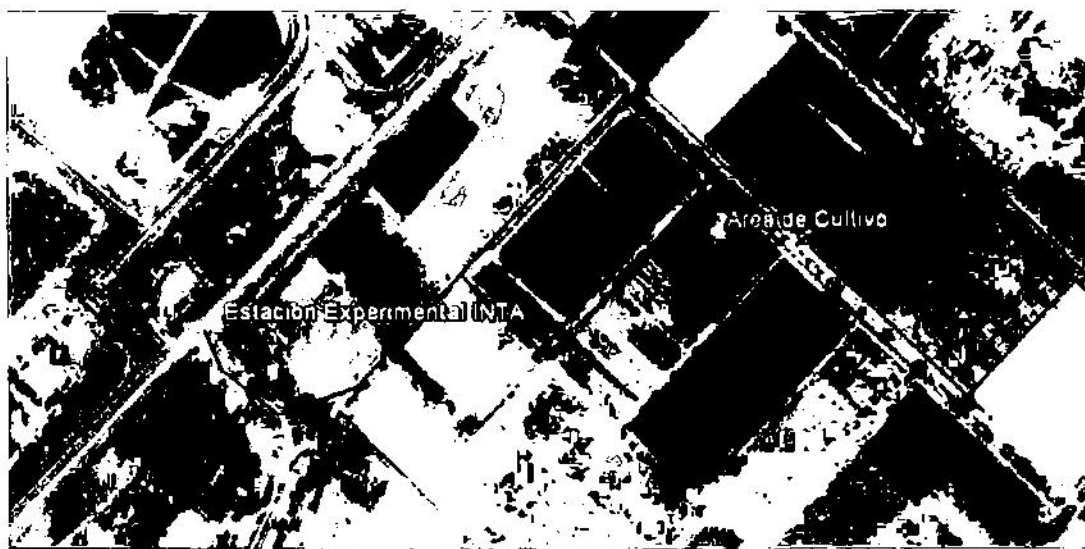


Figura 4: Ubicación del área de cultivo (Tomado de Google Earth).

Alumno: Cayuqueo Victor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## 2. Composición nutricional de parentales

Se evaluó la composición nutricional de las harinas de las semillas de las plantas utilizadas como parentales: *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hybridus*.

### 2.1. Cenizas totales

La determinación de cenizas totales se realizó de acuerdo a Kirk *et al.* (1996), con algunas modificaciones. Se pesaron 4 g de cada una de las muestras y se calcinaron. En primer lugar, cada muestra se quemó con un mechero bajo campana hasta que no se desprendieran humos y posteriormente se introdujo a la mufla 2 horas, a 550 °C. Se obtuvieron cenizas blancas o ligeramente grises y homogéneas. Por último, las muestras se enfriaron en desecador y se pesaron. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.2 Extracción y cuantificación de lípidos

Para la cuantificación de lípidos se usó el método de Soxhlet en el cual se pesaron 5 g de muestra seca y se utilizó éter etílico como solvente de extracción. Las muestras fueron calentadas durante 2 h y el balón donde se extrajeron los lípidos se secó en estufa a 60°C. Por pesada se determinó el contenido de aceite. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.3 Contenido de carbohidratos totales

Para la determinación de carbohidratos totales se utilizaron 4 g de harina que fueron sometidas a una hidrólisis ácida para obtener los azúcares totales. Estos fueron cuantificados por el Método de Fehling-Causse-Bonnans (AOAC, 1965). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## 2.4 Contenido de proteínas totales

El contenido de proteína se cuantificó en todas las líneas seleccionadas de la F2 por el método de Kjeldahl (método 32.1.22, AOAC), utilizando el factor 6,25. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

## 3. Selección de Líneas

Como se resumió en la figura 3, se seleccionaron 9 líneas dentro de la población F2, a las cuales se le dió un nombre vulgar a cada una de ellas de acuerdo con sus particularidades fenotípicas (Tabla 2).

Tabla 2: Líneas de amaranto seleccionadas.

Líneas	Características
Testigo 1	<i>Amaranthus Cruentus Mexicano</i>
Línea 2	Semilla Negra, surco 1
Línea 3	Semilla Blanca, surco 1
Línea 4	Semilla Negra, surco 10
Línea 5	Semilla Blanca, surco 2
Línea 6	Semilla Blanca, surco 4
Línea 7	Semilla Blanca, surco 6
Línea 8	Semilla Blanca, surco 5
Línea 9	Semilla Blanca, surco 2
Línea 10	Semilla Blanca, surco 10

## 4. Obtención de harinas

Las panojas de las 9 líneas seleccionadas en F2 fueron trilladas y tamizadas con un tamiz de 2 mm para dejar las semillas sin ningún tipo de impurezas o restos que perjudique los futuros análisis. Los granos de cada línea fueron procesados con un molino de cuchillas de 24000 rpm (Numax) y luego tamizadas (500 µm) para obtener una harina integral homogénea.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## 5. Obtención de aislados proteicos

La obtención de aislados proteicos se realizó a partir de la harina, se utilizó el solvente dimetilsulfóxido (DMSO) al 50 % v/v en una relación 1:10 p/v. Las suspensiones fueron mantenidas 3 horas a temperatura ambiente y en agitación constante (500 rpm). Luego fueron centrifugadas durante 20 minutos a 7000 rpm y al sobrenadante se le determinó el contenido de proteína soluble por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL como proteína patrón. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 5.1. Caracterización fisicoquímica

Los aislados obtenidos se caracterizaron mediante electroforesis desnaturante y reductora por el método SDS-PAGE de Laemmli (1970). El marcador molecular que se utilizó: Estándar preteñido de amplio rango (BIO RAD). Proteínas de estándar: Myosin 198135;  $\beta$ - galactosidase 103158; BSA 58156; Ovalbumin 41596; Carbonic anhydrase 27704; Soybean trypsin inhibitor 20537; Lysozyme 15204 y Aprotinin 6456.

## 6. Determinación de actividad hemoaglutinante en aislados proteicos

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de una manera similar a los anticuerpos. La actividad hemoaglutinante se determinó por el procedimiento de Crowley & Goldstein (1982). Las células rojas de la sangre grupo sanguíneo "0" factor Rh positivo, se lavaron con solución fisiológica y fueron re suspendidas al 4 %v/v nuevamente en la solución fisiológica. Se prepararon diferentes diluciones seriadas (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) de cada uno de los extractos y se agregaron 50  $\mu$ L de cada uno de ellos en una placa multiposillo donde previamente se habían agregado 50  $\mu$ L de la suspensión de glóbulos rojos. Luego de 1 hora en incubación a 30°C se determinó la actividad hemoaglutinante. Una unidad de hemoaglutinación se

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".



define como la mínima cantidad de lectina capaz de aglutinar células y es equivalente a una concentración de 2 µg/mL de lectina (Rinderle *et al.*, 1989).

## **7. Composición nutricional de semillas de las líneas de amaranto seleccionadas**

Se evaluó la composición nutricional de las harinas con mayor contenido de lectinas como se describió previamente en la sección 2.

### **7.1 Cálculo del valor nutritivo**

El valor nutritivo de las semillas de amaranto seleccionadas se calculó de acuerdo a Indrayan *et al.* (2011) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{VN (Cal/100g)} = 4 \times \text{Proteína total (\%)} + 9 \times \text{Lípidos (\%)} + 4 \times \text{Carbohidratos (\%)}$$

## **8. Tratamiento de los resultados**

Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de ANOVA y el test Tukey utilizando el programa informático InfoStat versión libre.

A continuación en la Figura 5 se muestra en forma resumida la metodología utilizada en este trabajo de tesis.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

### 9 Líneas Seleccionadas de la F2

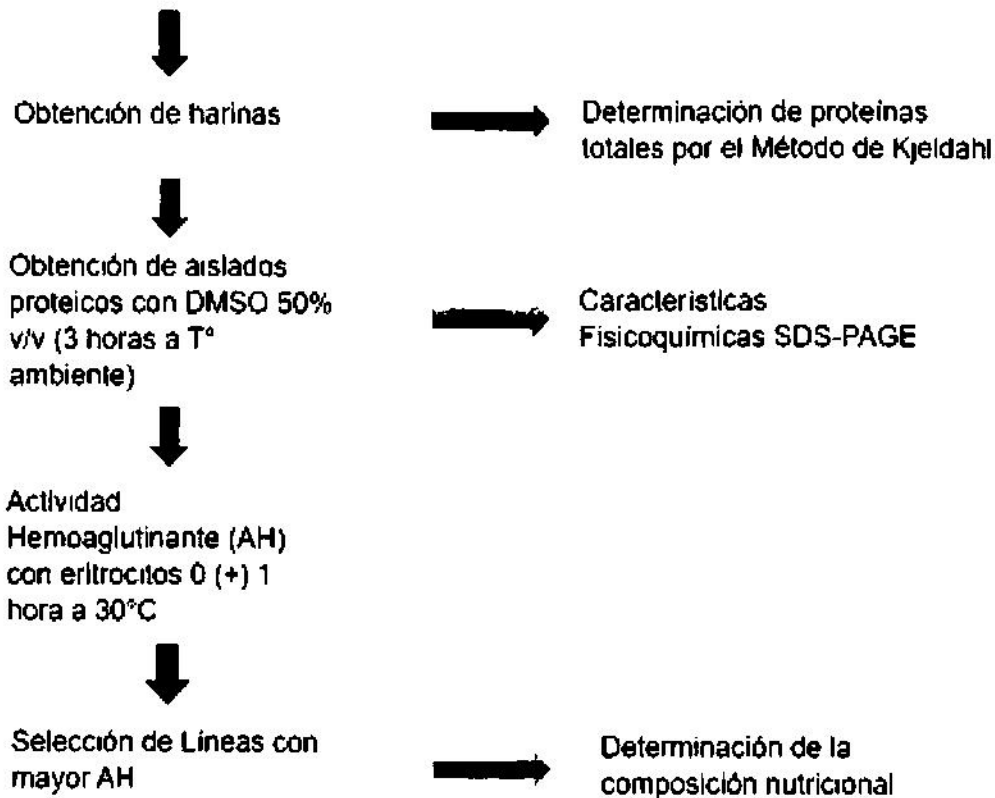


Figura 5: Procedimiento llevado a cabo para la caracterización química de las 9 líneas.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Caracterización nutricional de parentales

Todos los seres humanos requieren una serie de compuestos orgánicos complejos para satisfacer los requerimientos calóricos necesarios para vivir. Los carbohidratos, grasas y las proteínas forman la mayor parte de la dieta, determinando el valor nutritivo de un alimento.

El análisis de la composición centesimal de la harina de amaranto permite conocer el contenido de proteínas, lípidos e hidratos de carbono para poder calcular el valor nutricional de la misma. En este sentido, harinas de los cultivares utilizados como parentales: *Amaranthus cruentus* cv Mexicano y *Amaranthus hybridus* fueron evaluadas. El *A. cruentus* cv Mexicano L. es utilizado para la producción de grano en la zona norpatagónica y el *A. hybridus* L, -ex *Amaranthus quitensis*- es considerado una maleza de la zona.

Los resultados obtenidos del análisis centesimal de las harinas se muestran en la figura 6 y concuerdan con los datos publicados por otros autores para estas variedades (Calderón *et al.*, 1991; Bressani *et al.*, 1993; Hevia *et al.*, 2002).

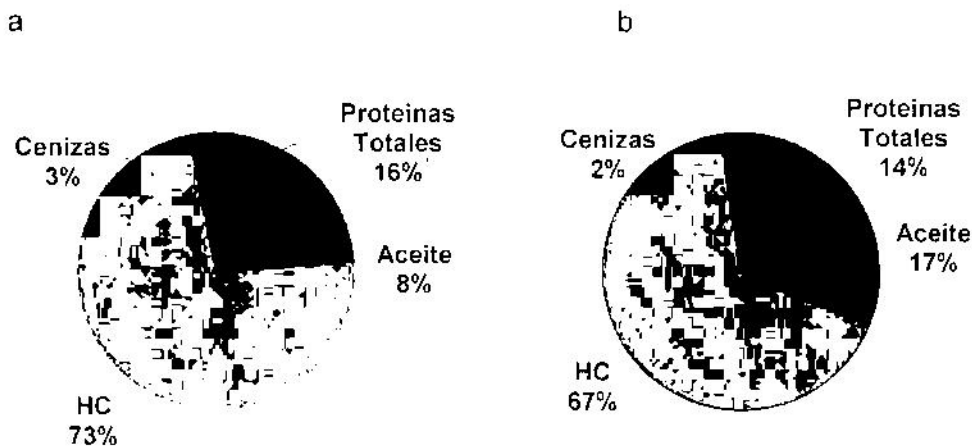


Figura 6: Composición centesimal de a) *A. cruentus* y b) *A. hybridus*. Los resultados se expresan a través de porcentajes y son el promedio de tres determinaciones independientes.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

Se observaron diferencias en el contenido de proteínas totales y en el contenido de aceite. La variedad *A. hybridus* posee un 100% más que la variedad *cruentus*.

## **2. Contenido proteico de harinas**

El contenido de proteínas en amaranto suele ser considerado alto cuando es comparado con cereales como el trigo (8-16%) (Juárez *et al.*, 2014). A diferencia de la mayoría de los granos, las proteínas del amaranto son compuestas principalmente de globulinas y albuminas y muy poco de prolaminas las cuales están relacionadas con la celiacua. Así, este pseudocereal tiene una composición balanceada de aminoácidos y en particular un mayor contenido de aminoácidos esenciales que los cereales más comunes. (Aubrecht & Biacs, 2001; Gorinstein *et al.*, 2002; Drzewiecki *et al.*, 2003).

Dado que uno de nuestros objetivos era seleccionar líneas con alto contenido de lectinas y proteínas, se determinó la cantidad de nitrógeno total por el método de Kjeldahl, pudiéndose así estimar el valor biológico de las harinas. Se evaluó el contenido de proteínas totales en las nueve líneas seleccionadas de la F2 y los valores obtenidos se resumen en la Tabla 3.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

Tabla 3: Proteínas totales en las harinas de las líneas seleccionadas.

Líneas	Proteínas Totales (%)	$p > 0,01$
4	11,5 ± 0,5	a
9	12,6 ± 0,7	a b
7	14,8 ± 0,1	b c
3	15,6 ± 0,1	c
2	15,6 ± 0,1	c
5	16,1 ± 0,2	c
6	16,3 ± 0,3	c
8	16,4 ± 0,4	c
10	16,5 ± 0,1	c

Los resultados de proteínas están expresados en porcentaje, y corresponden al promedio de tres determinaciones independientes con su desvío estándar correspondiente. Se realizaron los análisis estadísticos de ANOVA y Tukey.

El valor de proteínas totales (en base seca) de todas las líneas estudiadas se encuentra dentro del rango descrito para especies de *Amaranthus spp* (12,5-18 g/100 g PS) (Schnetzler & Breen, 1994). En este trabajo la única línea que posee un contenido menor de proteínas en comparación al trabajo citado es la 4 ya que el valor fue de 11,5 ± 0,5%. Las líneas con mayor contenido proteico fueron: Línea 5 con 16,1 ± 0,2%; Línea 6 con 16,3 ± 0,3%; Línea 8 con 16,4 ± 0,4% y la Línea 10 con 16,5 ± 0,1%.

### 3. Caracterización fisicoquímica de las proteínas de los granos de amaranto

En las semillas de amaranto se ha descrito una proteína de reserva con un peso mayor de 300 kDa denominada amarantina (Martínez & Añón, 1996). Esta proteína tiene la estructura de un hexámero constituido por seis subunidades de 60 kDa. A su vez, cada una de estas subunidades está compuesta por dos péptidos (A y B) de 40 y 20 kDa unidos por puentes disulfuro.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

El perfil electroforético de proteínas de amaranto (Fig. 7), extraídas con DMSO al 50 % v/v, en condiciones desnaturizantes mostró un patrón de bandas comunes para todas las líneas estudiadas. Los péptidos de las semillas de amaranto pueden dividirse en tres grupos. Por un lado, uno bien definido entre 42 y 64 kDa. Se ha sugerido que estos péptidos pueden representar una forma inmadura y más variable de subunidades A-B de la amarantina que, por causas desconocidas, no se disocia en los péptidos A y B tras el tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol (Martínez & Añón, 1996). Otro grupo de péptidos está constituido por moléculas con un peso entre 33 y 37 kDa. Estos péptidos corresponden a la subunidad A de la amarantina. Un tercer grupo está formado por péptidos entre 18 y 25 kDa. Estos péptidos, que corresponden a la subunidad B de la amarantina, presentan una mayor variabilidad respecto a los pesos moleculares en relación con la subunidad A. La banda de 35 kDa correspondería a la lectina de amaranto. Además, se puede observar en la línea 7 una proteína con una masa molecular aproximada de 65-70 kDa (dímero de lectina), la misma podría estar compuesta por dos subunidades de aproximadamente 35 kDa característica de las lectinas.

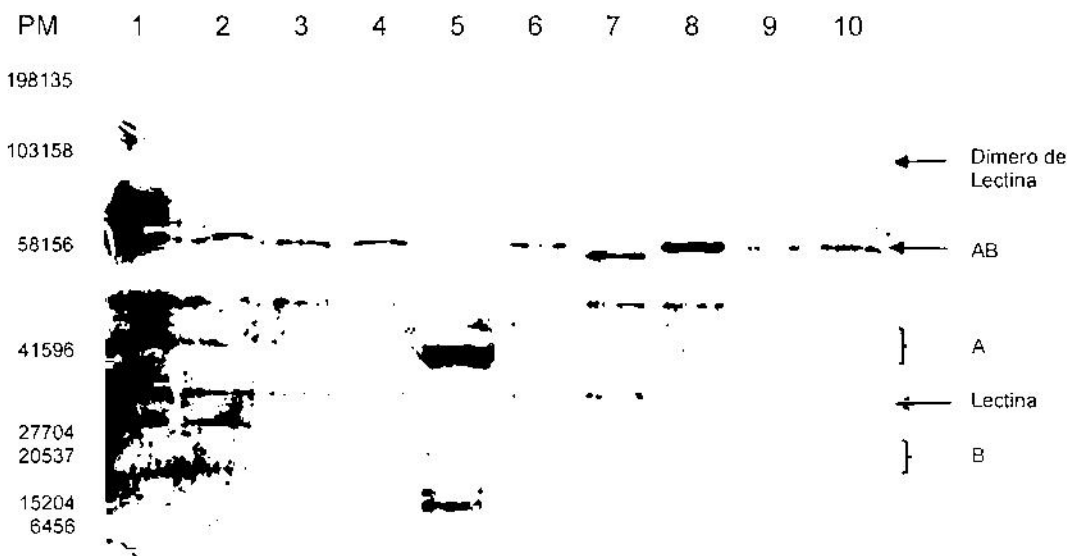


Figura 7: Electroforesis en condiciones desnaturizantes. Calle 1: Línea 2; Calle 2: Línea 3; Calle 3: Línea 4; Calle 4: Línea 5; Calle 5: Marcador de peso molecular; Calle 6: Línea 6; Calle 7: Línea 7; Calle 8: Línea 8; Calle 9: Línea 9 y Calle 10: Línea 10.

Alumno: Cayuqueo Victor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

#### 4. Determinación del contenido de lectinas

Durante varias décadas, las lectinas de plantas fueron consideradas sustancias tóxicas para las células y los animales denominándose factores antinutricionales. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que poseen un efecto inhibitor en el desarrollo del cáncer y hay una tendencia actual en la utilización de lectinas vegetales en la lucha contra éste (Liu *et al.*, 2010).

El contenido de lectinas en las nueve líneas fue determinado midiendo la actividad hemoaglutinante de los extractos en DMSO 50%v/v. La mínima cantidad de lectinas que es capaz de aglutinar eritrocitos es de 2 µg/mL (Rinderle *et al.*, 1989).

En la Tabla 4 se puede observar que las líneas con mayor cantidad de lectina fueron las 7, 9 y 10. La línea 7 expresó aproximadamente 8 veces más el contenido de lectinas con respecto a las líneas 2, 3, 4, 5 y 6; y 1,5 veces más que las líneas 9 y 10. No obstante, las líneas 9 y 10 también presentan un contenido de lectinas superior a las líneas 2, 3, 4, 5, 6 y 8. Estos resultados también demuestran que a mayor solubilización de proteínas en el solvente dimetilsulfóxido, la cantidad de lectinas es mayor. Esto podría deberse al carácter hidrofóbico característico de este tipo de proteínas. Koeppe & Rupnow (1988) determinaron el contenido de lectinas en diferentes especies de *Amaranthus*. Los valores de aglutininas obtenidos en las líneas 7, 8, 9 y 10 están en el mismo orden a los descrito por estos autores, sin embargo, en las líneas 2, 3, 4, 5 y 6 los mg de lectina/mg de proteínas son de un orden menor. No obstante, estas líneas podrían ser consideradas en futuras investigaciones, dado que el contenido de proteínas es similar al parental *A. cruentus*. En relación, su menor contenido de lectinas podría ser un aspecto a considerar ya que estas proteínas también han sido descritas como factores antinutricionales.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

Tabla 4: Contenido de lectinas en líneas seleccionadas.

Líneas	Dilución	Proteínas Solubles (µg/mL)	Lectina (mg de lectina/mg de proteína total)	$p > 0,05$
5	1:02	248	0,065	a
2	1:02	306	0,052	a b
4	1:02	308	0,052	a b
6	1:02	348	0,046	a b
3	1:02	354	0,045	a b
8	1:08	405	0,158	a b c
9	1:16	469	0,273	b c
10	1:16	488	0,262	b c
7	1:32	599	0,427	c

Se realizaron los análisis estadísticos ANOVA y Tukey.

A partir de los resultados obtenidos por actividad hemoaglutinante las líneas 7, 9 y 10 fueron seleccionadas para determinar su valor nutritivo por su alto contenido de lectinas.

##### 5. Composición nutricional de las harinas integrales en líneas 7, 9 y 10

La composición nutricional de las harinas de las líneas 7, 9 y 10 fue determinada (Fig. 8) y el valor nutritivo fue estimado (Fig. 9). De esta manera, se pudo comparar la composición centesimal de las líneas con sus parentales *Amaranthus cruentus* cultivar Mexicano y *Amaranthus hybridus* L. (Fig. 6).

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".



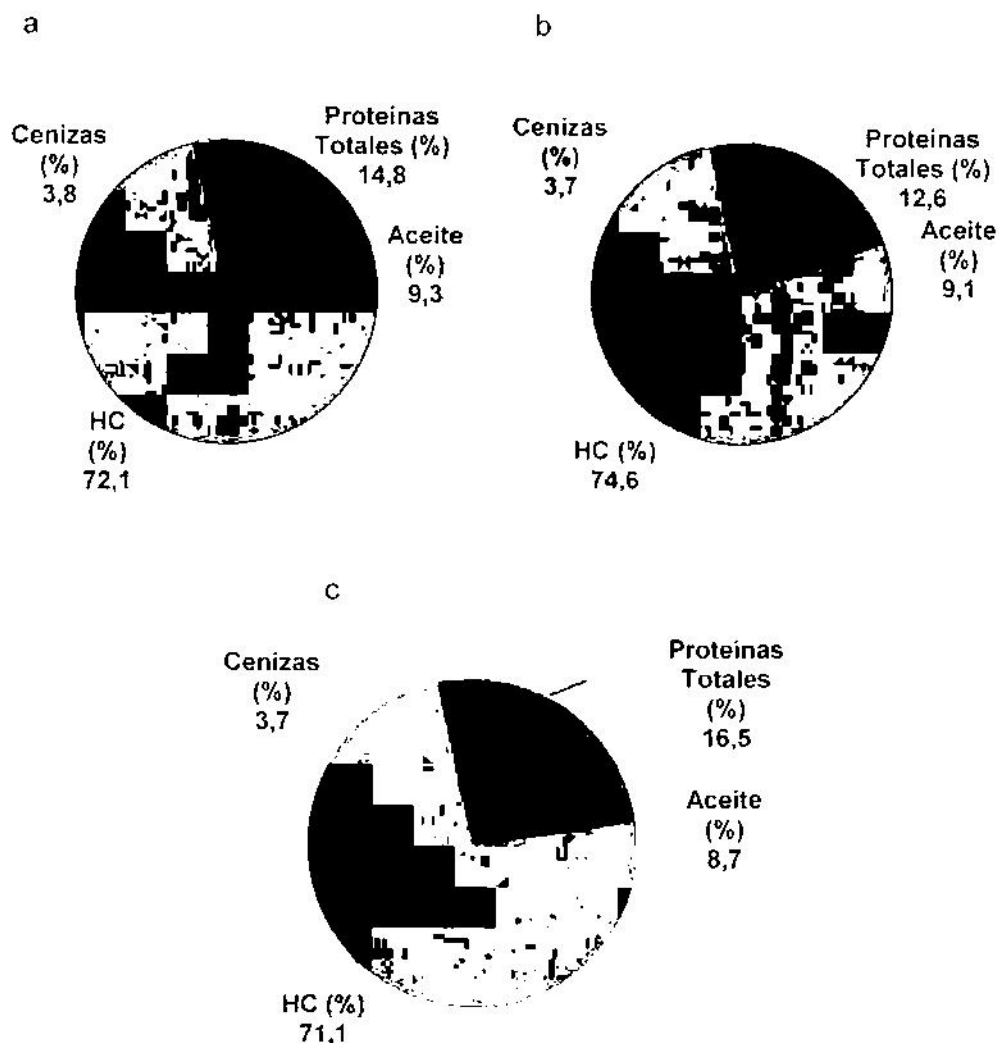


Figura 8: Composición centesimal de líneas seleccionadas: a) Línea 7; b) Línea 9 y c) Línea 10. Los resultados se expresan como porcentaje en base seca y son el promedio de tres determinaciones independientes.

En la figura 8 se observa que la harina de la línea 10 es la que mayor contenido de proteínas mostró ( $16,5 \pm 0,1\%$ ) sin embargo, no se observa una correlación directa entre el contenido total de proteínas y el contenido de lectinas extraídas con el solvente dimetilsulfóxido 50 %v/v. De estos resultados también puede deducirse que el contenido de lípidos es del orden del parental *A. cruentus*. Este parámetro es importante que sea menor al 10% ya que los lípidos

Alumno: Cayuqueo Victor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

pueden afectar la durabilidad de las harinas. Los resultados obtenidos se encuentran en el rango de valores que han sido determinados para el género *Amaranthus* según lo establece el Código Alimentario Argentino.

Sobre la base de estos resultados es posible calcular el valor energético de las harinas integrales de las 3 líneas seleccionadas (7, 9 y 10).

El valor energético o calórico de las harinas proporciona una medida de la cantidad de energía máxima que proporciona la misma. La figura 9 muestra el valor energético de las harinas integrales de las líneas 7, 9 y 10 así como también, el de los parentales. Las tres líneas no presentan diferencias entre ellas ni con el parental *A. cruentus* mostrando un valor energético inferior que *A. hybridus* (aproximadamente 50 Cal/100 g menos). La diferencia con *A. hybridus* se debe principalmente a que el contenido de lípidos en este es aproximadamente un 100 % mayor que *A. cruentus* y las líneas seleccionadas.

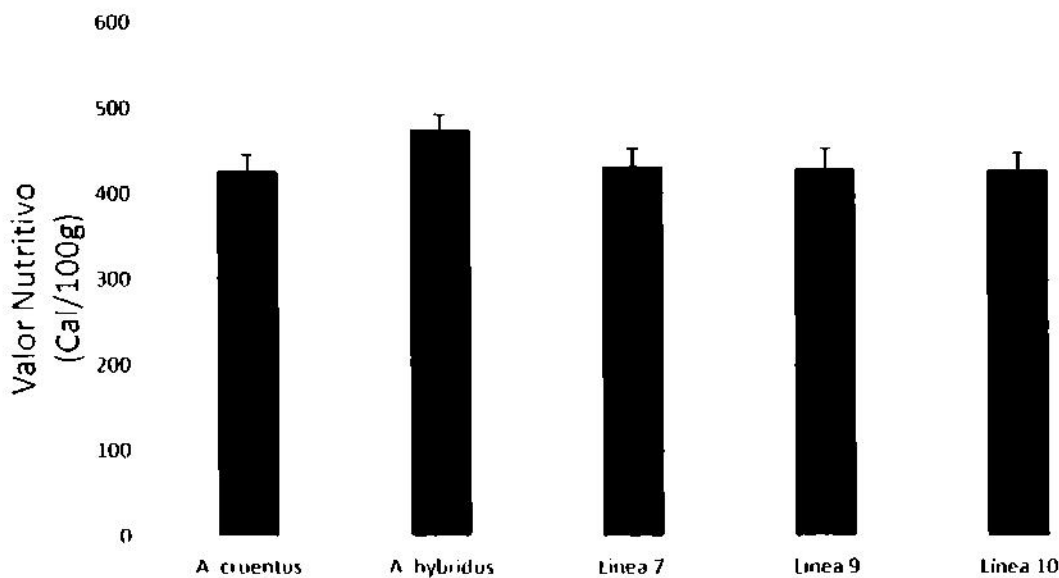


Figura 9: Valor nutritivo de líneas seleccionadas y comparación con los parentales (*A. cruentus* y *A. hybridus*).

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## CONCLUSIONES

1. Se observaron diferencias tanto en el contenido de aceite como de proteínas de los parentales.
2. En cuanto al contenido de proteínas, las líneas 4 y 9 mostraron diferencias con respecto a sus parentales, mientras que las líneas 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 se aproximan con el parental *A. cruentus* y la línea 7 se corresponde con *A. hybridus*.
3. Los perfiles electroforéticos de todos los aislados proteicos mostraron la presencia de una banda de 35 kDa que correspondería al monómero de lectina.
4. Las líneas 7, 9 y 10 fueron las que mayor actividad hemoaglutinante mostraron y fueron seleccionadas por alto contenido de lectinas.
5. El contenido de proteínas solubles en DMSO (50% v/v) es proporcional a la cantidad de hemoaglutininas en el extracto.
6. Los valores energéticos de las líneas seleccionadas se asemejan más a uno de sus parentales (*A. cruentus*).

BIBLIOGRAFIA:

- Abdullaev, A. & Gonzalez de Mejia, R. 1997. Antitumor Effect of Plant Lectins. *Natural toxins* 5:157–163.
- Aubrecht, E., & Biacs, P. A. 2001. Characterization of buckwheat grain proteins and its products. *Acta Alimentaria*, 28: 261-268.
- Barrio, D.A. & Añón, M.C. 2010. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European Journal of Nutrition*, 49: 73-82.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytic Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bressani, R.; De Martell, R. & Godinez, E. 1993. Protein quality evaluation of amaranth in adult humans. *Plants Food Human Nutr.* 43: 123-143.
- Calderón, E.; Gonzalez, E. & Bressani, R. 1991. Características agronómicas, físicas, químicas y nutricias de quince variedades de amaranto. *Turrialba*. 41: 458-464.
- Caselato-Sousa, V.M. & Amaya-Farfán, J. 2012. State of Knowledge on Amaranth Grain: A Comprehensive Review. *Journal of Food Science*, 77: R93-R104.
- Covas, G. 1994. Perspectivas del cultivo de los amarantos en la República Argentina, *Boletín INTAEEA Anguil*. Publicación Miscelánea nro. 13.
- Crowley, D. & Goldstein, E. 1982. *Datura stramonium* lectin. *Methods Enzymology*. 83: 368–373.
- Dimitri, M. J. & Parodi, L. R. 1980. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería; Descripción de las plantas cultivadas Tomo I*.
- Drzewiecki, J.; Delgado-Licon, E.; Haruenkit, R.; Pawelzik, E.; Martin-Belloso, O.; Park, Y.-S.; et al. 2003. Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26): 7798-7804.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

## Ingeniería Agronómica.

- Estrella, E. 1986. El Pan de América, Etnohistoria de los alimentos aborígenes en el Ecuador. Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC. Centro de Estudios históricos. Madrid. 181p.
- Franssen, A.S.; Skinner, D.Z.; Al-Khatib, K.; Horak, M.J. & Kulakow, P.A. 2001. Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. *Weed Sci* 49: 598–606.
- Fritz, M.; Vecchi, B.; Rinaldi, G. & Añón, M.C. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*. 126: 878-884.
- Gorinstein, S.; Pawelzik, E.; Delgado-Licon, E.; Haruenkit, R.; Weisz, M. & Trakhtenberg, S. 2002. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 886-891.
- Hevia, H.; Berti, D. & Wilckens, E. 2002. Contenido de proteína y algunas características del almidón en semillas de amaranto (*Amaranthus spp.*) cultivado en Chillan, Chile. *Agro sur*. 30: 24-31.
- Juárez, S.; Bárcenas-Pozos, T. & Hernández, R. 2014. El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento.
- Kiez, R. 1992. Compendio del amaranto. Rescate y revitalización en Bolivia. Ed. Instituto de Latinoamericano de Investigaciones Sociales (ILDIS). La Paz, Bolivia. Ed. Garza Azul. Pág. 175.
- Kirk, R. S.; Sawyer, R. & Egan, H. 1996. Composición y análisis de alimentos. Segunda edición. Compañía editorial continental SA de CV, México.
- Koeppe, S. & Rupnow, M. 1988. Purification and Characterization of a Lectin from the Seeds of Amaranth (*Amaranthus cruentus*).
- Kwan, L. & Bun, N. 2011. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 89:45–55.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Alumno: Cayuqueo Victor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) de interés biológico".

- Lipkin, A.; Anisimova, V.; Nikonorova, A.; Babakov, A.; Krause, E.; Bienert, M. & Egorov, T. 2005. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 66 20: 2426-2431.
- Liu, B. & Bao, N. 2010. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters* 287: 1–12.
- Martínez, E. N. & Añón, M.C. 1996. Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal Agricultural Food Chemistry* 44:2523-2530.
- Morros, M.; Trujillo, B. & Ponce, M. 1990. Descripción del género *Amaranthus* L., con tres nuevos registros para Venezuela y consiguiente clave para las especies. *Revista Ernstia* 58-59-60:45-51.
- National Academy of Sciences. 1984. Amaranth: Modern Prospects for an Ancient Crop.
- Orsini Delgado, M.C.; Tironi, V.A., & Añón, M.C. 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8): 1752-1760.
- Quiroga, A.; Barrio, D.A. & Añón, M.C. 2014. Purification and identification of peptides from *Amaranthus mantegazzianus* with antitumor properties. *LWT-Food Science and Technology*.
- Quiroga, A.; Aphalo, P.; Ventureira, J.L.; Martínez, E. N. & Añón, M. C., 2012. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 397-403.
- Rinderle, E. Goldstein, E. & Remsen, P. 1989. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry*. 1989. 294: 17253-17255.
- Saunders, R. M. & Becker, R., 1984. "Amaranthus a potential food and feed resource", *Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, vol. VI: 357- 396.
- Schnetzler, K.A. & Breen, W.M. 1994. Food uses an Amaranth Product Research: A comprehensive Review. In *Amaranth Biology, Chemistry, and*

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".

Technology. St Ed., Paredes-López, O., Ed., CRC Press: Boca Ratón, FL. Chapter 9: 155-184.

- Segura-Nieto, M.; Barba de la Rosa, A. P. & Paredes-Lopez, O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. In *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*; Paredes-López, O., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL; pp 75-106.
- Tapia, M. 1997. Cultivos andinos sub explotados y su aporte a la alimentación. 2da. Edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile: 273.
- Tranel, P.J.; Wassom, J.J.; Jeschke, M.R. & Rayburn, A.L. 2002. Transmission of herbicide resistance from a monoecious to a dioecious weedy *Amaranthus* species. *Theor Appl Genet* 105: 674–679.
- Wetzel, D.K.; Horak, M.J.; Skinner, D.Z. & Kulakow, P.A. 1999. Transferal of herbicide resistance traits from *Amaranthus palmeri* to *Amaranthus tuberculatus*. *Weed Sci* 47: 538–543.

Alumno: Cayuqueo Víctor Esteban.

TEMA: "Evaluación y selección de líneas de Amarantho (*Amaranthus* spp.) de interés biológico".