



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA EL ESTADO DE HIDALGO

---

---

## INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

“Evaluación genotóxica de extractos proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y frijol tépari blanco (*Phaseolus acutifolius* var. *Latifolius*) por medio de la prueba de micronúcleos *in vivo*.”

### T E S I S

Para obtener el título de:

### QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

**Maciel Rivera Josué Eleazar**

Asesora:

Dra. María del Carmen Valadez Vega

Co-Asesora:

Dra. Raquel Cariño Cortés

Pachuca de Soto Hidalgo, 2008



**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO Y EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE LA EN LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**



**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD, UAEH.**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN**



## DEDICATORIA

*ESTA TESIS ESTA DEDICADA A TODAS LA PERSONAS QUE CREEN Y  
CREYERON EN MÍ...*

*A MIS PAPÁS, ELEAZAR MACIEL Y SILVIA RIVERA*

*A MIS HERMANOS, IRVING, VALERIE Y FATIMA Y POR SUPUESTO A CAMILA  
Y AL PEQUEÑO QUE VIENE EN CAMINO.*

*A MIS ASESORAS, DRA. MARIA DEL CARMEN VALADEZ VEGA Y DRA.  
RAQUEL CARIÑO CORTÉS.*

*“...Fuera del perro, un libro es probablemente el mejor amigo del hombre y dentro  
del perro probablemente esté muy oscuro para leer...”*

*Groucho Marx.*

## AGRADECIMIENTOS

**GRACIAS DIOS MÍO**, por haber dado la paciencia y serenidad durante toda mi tesis y toda mi carrera, gracias por las virtudes y defectos que me concediste, por que sin ellos no hubiese podido llegar hasta este punto mi vida...

Gracias, por haber dado la oportunidad de tener los **PAPÁS** que tengo, por que sin ellos sin sus consejos, sin sus palabras de aliento y también por que no los regaños que a veces bien merecidos... por enseñarme todo lo bueno, por todo el apoyo moral que me dieron para que no me rindiera, por todos los ejemplos de perseverancia, lucha día a día, trabajo... a mis **HERMANOS** a mi lado cuando más necesito de su apoyo y ayuda... simplemente por ser las personas mas importantes de mi vida...

Gracias, **Dra. Carmen** por compartir los conocimientos, por los consejos, por todos los momentos tan *cool's* que pudimos compartir durante todo este tiempo, por haberme llevado al congreso en Querétaro, estuvo *fantabuloso...muchas muchas* Gracias.

Gracia, **Dra. Raquel** por haberme dado la oportunidad de conocerla, aun que haya sido poco tiempo fue muy grato, gracias por la atención que me dio aun que hubo algunas veces que haya sido en sábados y domingos, por haber contactado con la gente del IPN, fue grandioso la estancia allá...

Gracias, a mis **Sinodales** por haber compartido sus conocimientos y apoyarme para la elaboración de esta tesis.

Brothers **Mario, Osti, George, Bocho, Less** Gracias por el apoyo, por los grandes momentos de parrandas. Igual a los brothers de Pachuca **Juan Manuel, George, Juan Antonio, Paloma**, muchas gracias amigos.

Gracias, **Stephy** por llegar en el momento en el que mas lo necesitaba, gracias **MIA, WAN**.

A todas las personas que me apoyaron en el **icsa y en el poli**, mil gracias por que sin su apoyo no su huera podido realizar esta tesis.

Y no por ser los últimos son menos importantes al contrario, **Millones de Gracias** a todos **los ratoncitos** que me prestaron su vida para obtener mi título profesional, muchachos, **MIL GRACIAS**.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1.1.MATERIAL BIOLÓGICO	38
6.1.2.REACTIVOS	38
6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	39
6.3. MÉTODOS	40
6.3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS	40
6.3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	40
6.3.3. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS PROTEICOS	40
6.3.3.1. PREPARACIÓN DE ERITROCITOS	40
6.3.3.2. PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN	41
6.3.4. PRUEBA DE GENOTOXICIDAD	41
6.3.4.1. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL MEDIA (DL <sub>50</sub> )	41
6.3.4.1.1. PRIMERA ETAPA	41
6.3.4.1.2. SEGUNDA ETAPA	42
6.3.4.2. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS	42
6.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
7.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	43
7.2. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS PROTEICOS.	47
7.3. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL MEDIA (DL <sub>50</sub> ) DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS	51
7.4. EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA	53
7.4.1. <i>Phaseolus acutifolius</i> var. <i>Latifolius</i>	53
7.4.2. <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	54
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. PERSPECTIVAS	62
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN- Ácido desoxirribonucleico

DL<sub>50</sub>- Dosis Letal media

EPC- Eritrocitos Policromáticos

EPCMN- Eritrocitos Policromáticos Micronucleados

ET- Eritrocitos Totales

FAO- Food and Agriculture Organization

Fig- Figura

g- gramos

h- horas

IA- Inhibidores de Amilasa

IT- Inhibidores de tripsina

Kg- Kilogramos

mg- miligramos

mL- mililitros

OMS- Organización Mundial de la Salud

TA- Título de Aglutinación

UH- Unidades de Hemólisis

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FRIJOL EN 100g	16
TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES CEREALES CONSUMIDOS EN EL MUNDO.	18
TABLA 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE AMARANTO (POR 100 g DE PARTE COMESTIBLE Y EN BASE SECA).	20
TABLA 4. CONTENIDO DE PROTEÍNA Y CONTENIDO DE GRASA DEL AMARANTO COMPARADO A LOS PRINCIPALES CEREALES.	20
TABLA 5. CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA DE AMARANTO (mg DE AMINOÁCIDOS / g DE PROTEÍNA).	21
TABLA 6. CONTENIDO DE PROTEÍNA DE VARIAS ESPECIES DE AMARANTO (g/100 g).	21
TABLA 7. COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE AMARANTO.	22
TABLA 8. INHIBIDORES DE TRIPSINA DE ORIGEN VEGETAL.	25
TABLA 9. PORCENTAJES APROXIMADOS DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA GÉNESIS DE CÁNCER EN SERES HUMANOS	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1 FORMAS ESTRUCTURALES DE SAPOGENINAS	27
Fig 2 MIOINOSITOL 1, 2, 3, 4, 5, 6- HEXAFOSFATO O ÁCIDO FÍTICO.	30
Fig 3 ERITROCITOS POLICROMÁTICOS MICRONUCLEADOS	33
Fig 4 FORMACIÓN DE MICRONÚCLEO DURANTE EL PROCESO DE ERITROPOYESIS Y SU OBSERVACIÓN	34
Fig 5 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE LOWRY	45
Fig 6 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE EXTRACTOS PROTEICOS.	46
Fig 7 TÍTULO DE HEMAGLUTINACIÓN DE PROTEÍNAS DE EXTRACTO PROTEICOS	49
Fig 8 ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LECTINAS DE EXTRACTOS PROTEICOS.	50
Fig 9 EFECTO GENOTÓXICO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FRIJOL TÉPARI BLANCO EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN.	57
Fig 10: EFECTO CITOTÓXICO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FRIJOL TÉPARI BLANCO EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN	58
Fig 11: EFECTO GENOTÓXICO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE AMARANTO (AMIX II) EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN	59
Fig 12 EFECTO CITOTÓXICO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE AMARANTO (AMIX II) EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN.	60

## I. RESUMEN

En la semilla del amaranto y en el frijol tépari blanco existe un alto contenido de proteínas, minerales, vitaminas del grupo B, vitamina C y ácido fólico; además de que ambos contienen compuestos antifisiológicos, como lectinas, inhibidores enzimáticos, saponina, taninos y compuestos cianogénicos, los cuales pueden interferir en la absorción de nutrientes ocasionando daño en mucosa intestinal, también puede afectar la digestibilidad de proteínas y carbohidratos, lo que provoca daños en la salud de seres humanos y de animales, estudios de la valoración la toxicidad del frijol tépari blanco han demostrado que compuestos de tipo proteico como las lectinas, al ser aisladas y purificadas fueron moderadamente tóxicos sobre ratones macho de la cepa CD1<sup>+</sup>, con respecto al amaranto no se han reportado ningún tipo de estudio acerca de la evaluación de la toxicidad de compuestos de carácter proteico. Hasta el momento no se han publicado estudios de la evaluación de la genotoxicidad *in vivo* de extractos proteicos de amaranto y frijol tépari blanco; por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la genotoxicidad de extractos proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y frijol tépari blanco (*Phaseolus acutifolius*) por medio de la prueba de micronúcleos *in vivo*. Se procedió a la obtención de extractos proteicos y a la determinación de proteínas solubles de las de semillas con el método de Lowry, la determinación de la presencia de lectinas mediante la técnica de diluciones seriadas por el método de Jaffé, posteriormente, se procedió a la obtención del la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) por el método de Lorke, la evaluación mutagénica mediante un ensayo agudo con la técnica de micronúcleos *in vivo* ambos casos en ratones machos CD1<sup>+</sup>. La concentración de proteínas solubles fue de 1.51 mg/mL y 3.87 mg/mL del amaranto y del frijol respectivamente, se obtuvo una hemaglutinación positiva utilizando eritrocitos humanos tipo A y una actividad específica de 6759.79 TA/mg de los extractos de amaranto y 3339.25 TA/mL de los extractos proteicos de frijol tépari blanco. Para el extracto proteico de amaranto la DL<sub>50</sub> fue de 1264.9 mg/Kg vía i.p., resultando ser moderadamente tóxico mientras que para el caso del extracto frijol tépari blanco no reportó toxicidad aguda hasta con 5000 mg/Kg vía i.p. El extracto proteico del frijol tépari blanco reportó efecto genotóxico con dosis de 250, 500 y 1000 mg/Kg de peso de

ratón a las 48 h, se obtuvo estimulación de la eritropoyesis a partir de las 24 h para todas las concentraciones administradas. Se observó efecto genotóxico con los extractos proteicos de la harina del amaranto de Mixquiahuala (AMIX II) a una concentración de 250mg/Kg a partir de 48 hasta a las 96 h; la estimulación de la eritropoyesis se presentó desde las 24 h hasta las 96 h en todas las concentraciones administradas. Dichos resultados sugieren la necesidad de confirmar su toxicidad con otros modelos y dosis e identificar a los componentes activos de los extractos, para determinar las dosis de riesgo en humanos.

## II. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas como los cereales son una fuente rica y económica de proteínas, carbohidratos, minerales y fibra dietética (Rehman, 2001); el frijol ocupa un lugar importante entre el grupo de las leguminosas, que a su vez es una de las de mayor producción en América Latina, África e India (Reyes y Paredes-López, 1993). La composición química del frijol común presenta un contenido de proteína entre el 23-33% (Sgarbieri y Galeazzi, 1990); con respecto al contenido de lípidos se ha encontrado que varía del 1 al 3%, carbohidratos totales es de 57-67%, minerales como tales como calcio, fósforo, magnesio, hierro y zinc, aportando el 3% de minerales a la dieta (Taggart et al., 1983). Por otra parte, en las últimas décadas la semilla del amaranto se ha considerado como un pseudo-cereal, ya que tiene propiedades similares a las de los cereales pero botánicamente no lo es (Lehmann, 1991), tiene un alto contenido de proteínas del 16-18%, grasas alrededor del 5-8%, carbohidratos totales 64.5%, y minerales del 2.6% entre los que se encuentran el sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, hierro y níquel, además vitaminas del grupo B como la tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico (Jaffé, 1980; Martínez-Larralde, 1984).

En México, el cultivo de frijol representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo con diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le ha permitido trascender hasta la actualidad, su consumo es generalizado en todos los estratos sociales, por lo que la importancia de este grano en la dieta del país sigue siendo fundamental. Para el caso del amaranto, su consumo junto con el maíz y el frijol fue uno de los principales productos para la alimentación de las culturas precolombinas de América; con la llegada de los españoles a América y durante la conquista, hoy en día se ha ampliado su mercado de consumo humano y en países industrializados como Estados Unidos, Japón, Alemania, el amaranto ha sido considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la NASA como uno de los alimentos recomendados para el futuro (Salgado, 2006).

Se ha demostrado que en la composición química de los cereales y leguminosas presentan compuestos que pueden ser dañinos para la salud del hombre; así mismo el amaranto, como el frijol, contienen compuestos antinutricionales como: taninos, lectinas, inhibidores de tripsina y ácido fítico, entre otros, que causan efectos antifisiológicos a quien lo consume; es decir, pueden inhibir algunas enzimas, dañar la mucosa intestinal o modificar la absorción de nutrientes (Alfaro, 1998; Figueroa, 1984), pueden afectar la digestibilidad de proteínas y carbohidratos en los seres humanos y animales (Huissman, 1992).

Una de las preocupaciones del hombre es el consumir alimentos que tenga gran valor nutricional y de alta inocuidad (que no cause ningún tipo de daño al consumirlo); la salud de la población humana se ha visto comprometida por la exposición a agentes genotóxicos ya sean sintéticos o naturales que pueden ser consumidos en los alimentos y para saber si causan algún daño que involucre al material genético; se dispone actualmente de pruebas con las que se puede determinar detectar compuestos genotóxicos o determinar al grado de daño genético, estas pruebas pueden ser *in vitro* o *in vivo*; tales como, cariotipo, síntesis no programada de ADN, Prueba de Ames, Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Electroforesis de Células Unitarias (Ensayo Cometa), Prueba de Micronúcleos, por mencionar algunas de las más importantes.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. LEGUMINOSAS

Entendemos por leguminosas a todos los granos secos que vienen de vainas, como lo son: el frijol, haba, lenteja, soya y garbanzos y son un conjunto de especies que forman parte de la familia de las Leguminosas (*Leguminosae*). Los granos de las leguminosas contienen, hidratos de carbono solubles, variables entre el 50% y el 70%, bajo contenido en grasas (1-2%), alto porcentaje de proteínas, en general superior al 20%, fibras que varían en torno al 8% y sustancias minerales, próximas al 3%, destacando su alto contenido en calcio y hierro (FAO/OMS/ONU. 1985), también contienen ciertos componentes que dificultan la digestibilidad y causan trastornos que limitan su consumo, siendo muchos de ellos eliminados por la cocción (Antunes y Sgarbieri, 1980).

Dentro del grupo de las leguminosas se encuentra el frijol, que cuyo grano es una fuente de alimentación proteica de gran importancia en la dieta alimenticia de la población de bajos recursos económicos, este grano contiene 22% de proteínas de alta digestibilidad, es un alimento de alto valor energético, contiene alrededor de 70% de carbohidratos totales y además aporta cantidades importantes de minerales (Ca, Mg, Fe), Vitaminas A, B 1-Tiamina, B2-Riboflavina, C-ácido ascórbico, el frijol también es importante, porque tiene la cualidad de realizar la actividad simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico y así contribuye a mejorar la fertilidad de los suelos (Azevedo, et al., 2003).

##### 3.1.1. Frijol

Fue uno de los primeros granos cultivados en el mundo, la mayoría de las variedades actuales, tienen como origen África, Asia, y Medio Oriente; presuntamente, fue introducido en América por las tribus nómadas que cruzaron el estrecho Bering hasta Alaska; hay evidencia que en México, en el siglo décimo los aztecas usaron el frijol como un grano básico, y que los Incas lo introdujeron a Suramérica (FAO. 1990).

Su presencia a lo largo de la historia de México, lo ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identificación cultural, comparable con otros productos como el maíz y el chile, que son básicos para explicar la dieta alimentaria de ayer, hoy y muy probablemente del futuro. Se considera que en total existen alrededor de 150 especies de esta leguminosa, aunque en México estas descienden a 50, destacando las cuatro especies que el hombre ha domesticado, como son el *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* (frijol tépari), en nuestro país son las especies más importantes en cuanto a superficie sembrada y producción son las dos primeras (FAO, 1992).

#### 3.1.1.1. Composición Química del Frijol Tépari Blanco (*Phaseolus acutifolius*)

Se comenzó a cultivar en México hace más de 500 años, desde entonces, las variedades silvestres y las domesticadas se encuentran en muchos lugares de Norteamérica, principalmente al sur, y en México, asimismo se ha indicado que el área de origen está entre México y Guatemala. Los frijoles tépari contienen cantidades similares de proteína a las de otras leguminosas, la calidad biológica de su proteína es superior a la del frijol común, especialmente la variedad blanca. Se ha indicado que tiene potencial como donador de genes para obtener mejores variedades de frijol desde el punto de vista culinario y nutricional, su alto contenido de lisina los hace excelente fuente suplementaria a los cereales, sin embargo, como en el caso de otras leguminosas, la proteína es deficiente en metionina (González de Mejía, 1988.).

En la tabla 1 se muestra la composición química del frijol por cada 100g, donde se puede notar una considerable diferencia entre la cantidad de proteína de la especie *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius* (Taggart, et al., 1983).

Tabla 1 Composición química del frijol en 100g

Tipo de Leguminosas	Proteína (g)	Niacina (mg)	Grasa (g)	CHO's (g)	Calcio (g)	Hierro (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)
Frijol Negro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	21.8	2.5	1.4	60.66	4.7	0.63	0.17	1.8
Frijol Blanco ( <i>Phaseolus acutifolius</i> )	22.5	2.7	1.1	64.7	4.6	0.6	0.15	1.8

Fuente: (Taggart, et al., 1983)

En el frijol tépari, la testa y el cotiledón representan el 8 y 92% de la composición principal de la semilla, respectivamente. La testa está formada por lípidos, proteínas, minerales, pectina, celulosa, hemicelulosa, y diferentes cantidades de compuestos polifenólicos. El cotiledón representa la mayor parte de la semilla, altamente organizada y las células que lo componen contiene grandes cantidades de gránulos de almidón los cuales se encuentran atrapados entre una matriz de cuerpos proteicos (Valadez-Vega, 1993).

Contiene de 7- 67% de carbohidratos totales en los que se encuentran rafinosa, estaquirosa y verbascosa, los cuales son encontrados de igual forma en la variedad blanca y son causantes de la flatulencia (se ha observado que los niveles de dichos compuestos en el frijol tépari silvestre es menor que en el de aquellas variedades domesticadas), contiene minerales tales como el calcio, fósforo, magnesio, manganeso, hierro y zinc que aporta el 8.7% a la dieta humana, en forma semejante que el frijol común. El contenido de lípidos en el frijol varía del 1-3% lo cual dependerá de la especie, origen, localización, clima, estación del año y tipo de suelo; en cuanto a su contenido proteico contiene el 22.2% aproximadamente. En 1978 Waines encontró que para las líneas de frijol tépari silvestre el contenido de proteína era del 22.1% mientras que para el domesticado fue de 20.4% el cual es superior al de algunas variedades de frijol

común donde dicho contenido es de 17%. La mayor parte de las proteínas del frijol tépari son globulinas (55-80%) y albúminas (10-20%) y cantidades menores de glutelinas (10%) y prolaminas (3%) (Valadez-Vega, 1993).

### **3.2. CEREALES**

Pertenecen a un grupo de plantas de la familia de las gramíneas *Gramineae* o *Poaceae* (Verissimo, 1999), el cultivo de cualquier cereal es relativamente sencillo y de bajo costo, es por ello, que todas las civilizaciones que han habitado el planeta han tomado a los cereales como fuente de vitaminas, minerales, proteínas, y otros nutrientes (FAO/OMS/ONU, 1985), en la tabla 2 se puede observar el contenido de algunos de los nutrientes presentes en los cereales de mayor consumo a nivel mundial (OMS).

En las últimas décadas se ha considerado el Amaranto como un pseudocereal ya que tiene propiedades similares a los cereales pero botánicamente no lo es, aunque todo el mundo lo ubica dentro de este grupo; a través del tiempo las variedades han sido utilizadas en forma ornamental, como vegetales comestibles y como cereal (Lehmann, 1991).

#### **3.2.1. Amaranto**

Es una planta que pertenece a la familia de los amarantaceae y al género *Amarhantus*, su nombre científico es *Amaranthus Spp*, la familia *Amaranthaceae* reúne cerca de 60 géneros y más de 800 especies cuyas características cambian notablemente, dependiendo del ambiente en el que crecen, lo que dificulta la identificación de la planta. Existen tres especies de amaranto que producen semilla y que a su vez son las más comercializadas por el hombre (AMA, 2006):

TABLA 2 Composición química de los principales cereales consumidos en el mundo.

NUTRIMENTO	AVENA	TRIGO	MAÍZ	ARROZ SILVESTRE	CEBADA	CENTENO
Energía (Kcal.)	389	329	365	370	354	335
Proteína (g)	16.09	15.4	9.4	7.9	12.5	14.8
Lípidos (g)	6.9	1.9	4.7	2.9	2.3	2.5
Grasa saturada (g)	1.22	0.31	0.67	0.58	0.49	0.29
Grasa monoinsaturada (g)	2.18	0.30	1.25	1.06	0.30	0.30
Grasa polinsaturada (g)	2.54	0.76	2.16	1.04	1.11	1.11
Carbohidratos (g)	66	68	74	77	73	70
Calcio (mg)	54	25	7	23	33	33
Hierro (mg)	4.72	3.6 2	.71	1.47	3.6	2.7
Sodio (mg)	2	2	35	7	12	6
Total fibra dietética (g)	10.3	12.8	13.5	3.5	17.3	---
Potasio (mg)	429 340	287	223	452	264	---
Magnesio (mg)	177	124	127	143	133	121
Fósforo (mg)	523	332	210	333	264	374
Zinc (mg)	3.97	2.78	2.21	2.02	2.77	3.73
Cobre (mg)	0.63	0.4	0.31	0.28	0.50	0.45
Manganeso (mg)	4.92	4.05	0.48	3.74	1.94	2.68
Tiamina (mg)	0.76	0.50	0.36	0.40	0.65	---
Riboflavina (mg)	0.14	0.11	0.20	0.09	0.29	---
Niacina (mg)	0.90	5.71	3.63	5.09	---	---
Ac. Pantoténico (mg)	1.35	0.94	0.42	1.49	---	---
Vitamina B6 (mg)	0.12	0.34	0.62	0.51	0.32	0.29
Ácido Fólico (mg)	56	43	20	19	---	---
Vitamina E (mg)	1.09	1.01	0.49	0.88	0.47	1.28

Fuente: Datos estadísticos de producción de cereales en el mundo WHO. 2005

- *Amaranthus caudatus*: se cultiva en la región de Los Andes y se comercializa como planta de ornato, principalmente en Europa y Norteamérica.
- *Amaranthus cruentus*: es originaria de México y Centroamérica, donde se cultiva principalmente para obtener grano, también se consume como vegetal.
- *Amaranthus hypochondriacus*: procedente de la parte central de México, se cultiva para obtener grano.

En México, fue uno de los cultivos prehispánicos de mayor relevancia, formaba parte de la dieta de los aztecas y lo nombraban "Huautli", constituía una de sus principales fuentes de proteínas, también lo cultivaban los mayas y para los incas era una planta sagrada a pesar de que casi desapareció de nuestras tierras debido a la prohibición que hicieron de esta planta los españoles hace más de 500 años (AMA, 2006).

Actualmente se cultiva en América Central, América del Sur, África, Asia y Europa, debido a su atractiva composición química y elevado valor nutritivo, se considera importante fomentar su producción, industrialización y utilización (Puntieri y Apro, 2004) y se ha ampliado su mercado de consumo humano en países industrializados como Estados Unidos, Japón, Alemania, el amaranto ha sido considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la NASA como uno de los alimentos recomendados para el futuro (Salgado, 2006).

#### 3.2.1.1. Composición Química del Amaranto

El contenido de proteína es elevado y algo superior al que presentan otros cereales tal como se muestran en las tablas 3 y 4 (Nieto, 1990; USDA, 1963), el balance de aminoácidos (Tabla 5) es similar al que presenta las proteínas de maíz, arroz y trigo, siendo los más limitantes la isoleucina e histidina, esto permite que la proteína de amaranto sea metabolizada por el ser humano con mayor facilidad (FAO/OMS/ONU, 1985; Collazos, et al., 1975). La proteína del amaranto se encuentra principalmente en el embrión a diferencia de otros cereales como

maíz, arroz que se encuentra en el endospermo (Bressani, 1989), existe una importante variación en el contenido de proteína en diferentes especies de amaranto que se muestra en la Tabla 6 (Bressani, 1989), contiene entre 5 y 8% de grasa (Tabla 4) (García, et al., 1987) y es reconocido por ser la fuente vegetal con mayor concentración de escualeno (6%) (Lyon y Becker, 1987; Rayas-Duarte. y Jobe, 1992); es una buena fuente de ácidos grasos linoleico y oleico (Tabla 7) (Casillas, 1986<sup>a</sup>).

Tabla 3 Composición química de la semilla de amaranto (por 100 g de parte comestible y en base seca)

Característica	Contenido
Proteína (g)	12 - 19
Carbohidratos (g)	71.8
Lípidos (g)	6.1 – 8.1
Fibra (g)	3.5 – 5.0
Cenizas (g)	3.0 – 3.3
Energía (Kcal)	391
Calcio (mg)	130 - 164
Fósforo (mg)	530
Potasio (mg)	800
Vitamina C (mg)	1.5

Fuente: Nieto, 1990.

Tabla 4 Contenido de proteína y contenido de grasa del amaranto comparado a los principales cereales.

Cereal	Proteína (g/100 g pasta comestible)	Contenido de grasa (extracto etéreo) %
Amaranto	13.6-18.0	7.2
Cebada	9.5-17	2.1
Maíz	9.4-14.2	4.4
Avena	15.0-17.3	4.4
Arroz	7.5	5.1
Centeno	9.4-14.0	2.1
Sorgo	9.5-11.0	3.4
Trigo	14.0-17.0	1.9

Fuente: USDA, 1963; García et al., 1987 .

Tabla 5 Contenido de aminoácidos de la proteína de amaranto (mg de aminoácidos / g de proteína).

Aminoácidos	Patrón de aminoácidos <sup>(a)</sup>	<i>Amaranthus. Caudatus</i> <sup>(b)</sup>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> <sup>(a)</sup>	<i>Amaranthus. cruentus</i> <sup>(b)</sup>
isoleucina	28	52	39	36
Leucina	66	46	57	51
Lisina	58	67	55	51
metionina + cistina	25	35	47	40
fenilalanina + tirosina	63	63	73	60
Treonina	34	51	36	34
triptofano	11	11	---	---
Valina	35	45	45	42
Histidina	19	25	25	24

Fuente: <sup>a</sup>FAO/OMS/ONU, 1985; <sup>b</sup>Collazos et al., 1975

Tabla 6 Contenido de proteína de varias especies de amaranto (g/100 g)

Especie	Nº de genotipos	Rango	Promedio
<i>Amaranthus. Caudatus</i>	36	11.1 – 19.4	13.5
A. <i>hypochondriacus</i>	26	12,7 – 17.9	15.5
<i>Amaranthus. cruentus</i>	21	13.0 – 20.6	15.7
<i>Amaranthus. hybridus</i>	2	13.1 – 14.3	13.7

Fuente: Bressani, 1989.

El amaranto contiene ácido fólico, que es una vitamina esencial para el hombre, y sobre todo para las mujeres en los años fértiles, la cual reduce hasta 75% de los defectos de cierre de tubo neural, que predisponen a espina bífida y anencefalia postnatal, en las mujeres embarazadas es la mayor probabilidad de

aborto natural o muerte del bebé, además protege contra el cáncer de ovario, así como la depresión y las enfermedades del corazón (AMA, 2006).

Tabla 7 Composición del aceite de la semilla de amaranto

Acido graso	Contenido (g/100 g)
Acido oleico	29.3
Ácido linoleico	44.0
Ácido palmítico	18.4
Ácido linolénico	1.3
Ácido mirístico	0.2
Ácido miristoleico	0.1
Ácido miristolénico	0.1
Ácido palmitoleico	0.8
Ácido palmitolénico	0.9
Ácido esteárico	3.8
Ácido no identificado	1.2

Fuente: Casillas, 1986a.

Las leguminosas y los cereales, tales como el frijol y el amaranto, además de ser una fuente de proteínas de buena calidad, carbohidratos, vitaminas, mineras, entre otros nutrientes, se ha observado que también presentan una gran cantidad y variedad de compuestos antifisiológicos, los cuales disminuyen la calidad nutricional de estos alimentos y que pueden afectar la fisiología normal de los consumidores (Cruz, 2001; Valadez-Vaga, 2005).

### **3.3. Compuestos Antifisiológicos**

El término hace referencia a aquellos compuestos presentes de manera natural en un alimento, interfieren negativamente, en mayor o menor grado en la absorción y metabolismos de sustancias nutritivas (Salgado, 2006).

Las leguminosas y los cereales contienen varios factores antinutricionales o tóxicos naturales, los cuales se encuentra en tres grupos principales: Derivados de

proteínas o aminoácidos: inhibidores de proteasas y hemaglutininas; Glucósidos: goitrógenos y cianogénicos; factores unidos a metales y antivitaminas: Fítatos, oxalatos (Valadez-Vega, 1993). A continuación se describen algunos aspectos relevantes de estos compuestos

### **3.3.1. Lectinas**

El término lectinas fue introducido por Boyd en 1954; su interpretación no ha sido uniforme debido al desconocimiento acerca de las funciones fisiológicas de éstas, existen diferentes proposiciones para definir las, pero la más aceptada es la siguiente: Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, fijadoras de carbohidratos con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados, la importancia del estudio de las lectinas se debe a que están presentes en casi todo ser vivo, pues se han encontrado en los vegetales, animales así como también en microorganismos. En las plantas se han detectado principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen del 2 al 10 % del total de las proteínas de éstas (Goldstein, 1980; Frane, 1982).

Entre los efectos tóxicos de algunas fitohemaglutininas se presenta el retraso del crecimiento, además de la inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema, ocasionando una interferencia no específica con la absorción de los nutrientes, por consiguiente un efecto drástico en la nutrición del organismo que las ingiere (Jaffé, 1980)

En un estudio de la evaluación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) realizado con lectinas puras de frijol tépari blanco determinaron que para ratones macho la dosis fue de 1100mg/Kg y para ratones hembra 1120mg/Kg ambos de la cepa CD1<sup>+</sup> (Reynoso-Camacho, et al., 2003). Valadez-Vega et al., (2005) determinaron el poder de inhibición celular de la lectina del frijol en células epiteliales de intestino delgado de ratas, demostrando que a pesar de que la concentración de lectina del frijol tépari blanco es más baja comparada con la actividad del frijol común, es mayor la actividad biológica.

En los cereales también se ha encontrado que la concentración de lectinas; tal es el caso del amaranto (*Amaranthus Cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus*) donde se encontró que la concentración de lectinas se ve afectada con tratamiento térmico de 70° C por 5 min (como lo pueden ser el reventado y germinado), disminuyendo la actividad específica en un 90% (Cruz, 2001; Salgado, 2005; Koeppe-Rupnow, 1988).

### **3.3.2. Inhibidores de Tripsina**

Son compuestos de carácter proteico que inhiben la capacidad proteolítica de la tripsina, enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos como el hombre. Gran parte de los alimentos de origen vegetal, presentan inhibidores de proteasas, dentro de los más estudiados, estos compuestos han sido aisladas de diferentes plantas o animales, entre las más relevantes están las de la soya, frijol, papa y del ovomucoide de los huevos de aves (Humphries, 1980; Kunitz, 1974; Liener, 1976).

Los inhibidores de tripsina (IT) más estudiados son los de origen vegetal, donde se encuentran ampliamente distribuidos; estos se pueden localizar en diversas partes de la planta siendo la semilla el lugar de mayor concentración, debido a que estas proteínas son necesarias para la semilla y empleadas durante la germinación de la planta; en la tabla 8 (Whitaker y Feeney, 1973; Weder, 1981; Savelkoul et al., 1992) se presentan los inhibidores de tripsina de origen vegetal mas conocidos.

Como se ha mencionado, estos compuestos tienen la habilidad de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina y por lo tanto reducen la digestibilidad de las proteínas y así mismo la absorción de los aminoácidos que las conforman, además interfieren en la regulación neuroendocrina del cuerpo por la liberación de colesistoquinina y otras hormonas peptídicas del intestino, estimulando el crecimiento del páncreas. Estas sustancias pueden inhibir enzimas digestivas,

dañar la mucosa intestinal o modificar los nutrientes obstaculizando de esta manera su absorción (Alfaro, 1988, Figueroa, 1984).

Tabla 8 Inhibidores de tripsina de origen vegetal.

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta
<i>Araquis hypogea</i>	Cacahuate,	Nuez o semilla
<i>Avena sativa</i>	Avena	Endospermo
<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha roja	Tubérculo
<i>Brassica rapa</i>	Nabo	Semilla
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	Semilla
<i>Glicine max</i>	Soya	Semilla
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Semilla
<i>Phaseolus coccineus</i>	Frijol frances	Semilla
<i>Phaseolus lunatus</i>	Frijol lima	Semilla
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol común	Semilla
<i>Pisum sativum</i>	Chicharo	Semilla
<i>Salomon tuberosum</i>	Papa	Tubérculo
<i>Vicia faba</i>	Haba	Semilla
<i>Zea mays</i>	Maíz	Semilla

Fuente: Whitaker y Feeney, 1973; Weder, 1981; Savelkoul et al., 1992.

Valadez-Vega (2005) reportó la presencia de IT en frijol tépari blanco observando que la concentración era menor en comparación con la del frijol común flor de mayo. Existen otras evidencias que indican que las concentraciones de IT del frijol tépari son mayores a las reportadas en ese año, esta diferencia puede deberse a que el genotipo, variedades y condiciones ambientales no fueron las mismas entre uno y otro estudio (Tinsley, et al., 1985).

La mayoría de los antecedentes de los inhibidores de tripsina son relacionados con las leguminosas, sin embargo hay que tener presentes que estos compuestos se encuentran en una gran variedad de alimentos, frutas, nueces, huevo, incluyendo a los cereales como el amaranto, que se ha encontrado que la concentración de estos compuestos se ve afectada según el lugar de siembra y si la semilla lleva algún tipo de tratamiento térmico, debido a que éste reduce los niveles de inhibidores de tripsina (Rackis, 1975),

Cruz en el 2001 realizó un estudio donde cuantificó la concentración de IT presentes en *Amaranthus hypochondriacus* crudo y con tratamiento térmico, germinadas y reventadas, se observaron concentraciones entre 0.51 UTI/mg y 1.01UTI/mg; para la semilla reventada y germinada no se encontró presencia de inhibidores de tripsina, como es bien sabido los IT son compuestos termolábiles, además de que en la germinación se disminuye la concentración de estos compuestos. Koeppe-Rupnow en 1985, reportaron concentraciones similares y Paredes-López, et al., en 1990 valores de 5.15 UTI/mg de muestra para la misma especie de amaranto utilizada en el 2001.

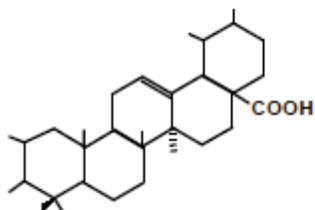
### **3.3.3. Saponinas**

Son glucósidos anfifílicos -anfipáticos- (que tiene un parte hidrofílica y otra parte hidrofóbica), en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos glurónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no-polar llamado sapogenina, la cual puede ser de tipo esteroidal o triterpenoide (Kimura S, 1976).

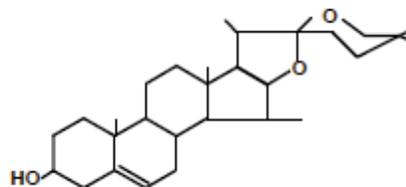
Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, donde se pueden encontrar en hojas, raíces, tallos y flores. Dentro de las plantas comestibles que contienen este tipo de compuestos, tenemos a las siguientes: soya, alfalfa, remolacha, espinacas, espárragos, avena, garbanzo, frijol. En la Figura 1 se muestra una sapogenina triterpenoide y otra esteroidal (Oakenfull, 1981; Basu, y Rastogi, 1967). La mayoría de las saponinas en alimentos son del tipo triterpenoide (Oakenfull, 1981; Fenwik, y Oakenfull, 1981; Hegsted y Linkswiler, 1980).

Estas sustancias tienen tres propiedades distintivas que son: sabor amargo; potentes surfactantes y producen hemólisis sobre los eritrocitos, es preciso recordar que en el organismo, las saponinas ocasionan dolor estomacal, nauseas, ligera diarrea y problemas en la digestión. Se ha visto que las saponinas también inhiben a ciertas enzimas importantes, como la succinato deshidrogenasa, esta

enzima es muy importante en el ciclo del ácido cítrico, el cual se requiere para que absorbamos los nutrientes y diversas funciones metabólicas (Birk, y Peri, 1980)



Ácido Asiático; (Sapogenina Triterpeniodes)



Diosgenina (Sapogenina Esteroidal)

Fig 1 Formas estructurales de Sapogeninas

Fuente: (Oakenfull, 1981; Fenwik, y Oakenfull, 1981; Hegsted y Linkswiler, 1980)

Kozuharov, et al., 1986, realizó un estudio donde alimentaron ratas con una dieta hipocolesterolémica (dieta testigo), otro grupo con 2 variedades de frijol común con diferente contenido de saponinas y se administró una dieta con saponinas aisladas de frijol blanco, las ratas alimentadas con saponinas aisladas del frijol blanco presentaron concentraciones inferiores de colesterol en comparación con el grupo testigo y el grado de mayor de reducción de colesterol fue causado por las 2 variedades de frijol común en comparación con el grupo que fue alimentado con saponinas del frijol blanco.

Las saponinas del amaranto constituyen un grupo de diversos glucósidos de alto peso molecular, formados por una o más cadenas carbohidratadas y una aglicona denominada sapogenina; estas saponinas son principalmente del tipo triterpenoide, considerando que actualmente se han llegado a identificar hasta 16 saponinas en distintas muestras de amaranto (Hevia, F. and Berti, R., 2002). En el año de 1995, Rastrelli et al., demostró la presencia de 7 saponinas triterpenoicas aisladas de la semilla del *Amaranthus caudatus*. Por otro lado, en diferentes muestra de *Amaranthus hypochondriacus*, se cuantificó la capacidad hemolítica con una concentración de saponinas entre 5.33 UH/mg de muestra y 10.66 UH/mg

provenientes de semilla sin tratamiento, para las semillas reventadas y germinadas no observó la presencia de saponinas, (Cruz, 2001).

#### **3.3.4. Taninos**

Los taninos se encuentran clasificados dentro del grupo de los fenoles poliméricos, presentes en leguminosas y cereales, los cuales son capaces de combinarse con las proteínas por medio de los grupos hidroxifenólicos mediante enlaces por puente de hidrógeno con algunos grupos de proteínas y enlaces hidrofóbicos que pueden contribuir a la estabilidad del complejo (Sathe y Sanlunke 1984). Los taninos fueron clasificados por Fredenberg en año de 1920 en dos grupos, de acuerdo a su estructura, hidrolizables y condensados, siendo los condensados son los más ampliamente distribuidos en las plantas (Deshpande et al., 1981).

Son compuestos con propiedades astringentes y antiinflamatorias, al ser capaces de secar y desinflamar la mucosa del tracto intestinal, resultan muy eficaces en el tratamiento de la diarrea; además, gracias a su actividad astringente ayudan a que la sangre realice su proceso de coagulación, por lo que presentan una acción antihemorrágica local, debido a la vasoconstricción que producen, y asimismo resultan beneficiosos en el tratamiento de las hemorroides (Deshpande et al., 1981).

La mayoría de los taninos polifenólicos se encuentran en pocas familias de dicotiledonias, como las leguminosas, en el frijol estos representan uno de los factores antinutricios. Se encuentran localizados principalmente en la testa y en bajas cantidades en los cotiledones, su contenido varía entre el 2.0% dependiendo la variedad del frijol (Sathe y Sanlunke 1984). Estudios han demostrado que el contenido de taninos en el frijol tépari son menores en comparación con las concentraciones que se obtuvieron al analizar el frijol flor de mayor, por lo que el nivel nutricional es menos afectado en el frijol tépari, además de que el potencial toxicológico causado por el frijol tépari es menor con respecto al de frijol común de la variedad flor de mayor (Valadez-Vega, 2005; González-De Mejía, 1988). De

manera general, en un estudio realizado por Valadez-Vega en el año de 1993 observó que las líneas de frijol con testa colorida son las que mayor contenido de taninos presentaron, mientras que aquellas que con menor coloración el contenido de taninos se vio disminuido.

Estudios realizados para la cuantificación de taninos en amaranto, presentó concentraciones entre 0.86-2.10 mg eq catequina para semillas sin tratamiento térmico; sin embargo cuando la semilla fue sometida a germinación o reventado se observó un aumento en el contenido de estos compuestos, dicho efecto pudo deberse a la coloración que se presentó y que alteró la lectura de la absorbancia; en el caso de la semilla reventada la coloración pudo ser ocasionada por la formación de pigmentos debidos a la reacción de Maillard producida por las proteínas al unirse con carbohidratos, mientras que para el germinado se produce una hidrólisis de almidón la cual toma una coloración roja (Cruz, 2001).

### **3.3.5. Ácido Fítico**

El ácido fítico es el éster hexafosfórico del ciclohexanol como se observa en la Figura 2; se encuentra en diferentes alimentos, principalmente en cereales, soya, zanahoria, el cual forma un complejo de fitato-mineral-proteína, tiene la capacidad de formar quelatos (Prattley, et al., 1983), incluso se ha sugerido que también pueden formar complejos con los carbohidratos. Este compuesto reduce la unión de la gastroferrina (proteína gástrica que contribuye a la absorción del hierro- $Fe^{+2}$ ), disminuyendo la absorción del calcio, magnesio, fósforo, zinc y molibdeno en el intestino, se ha observado que un gramo de ácido fítico, es capaz de secuestrar irreversiblemente un gramo de calcio, por lo que puede estar implicado en una deficiencia mineral cuando se consumen alimentos con alto contenido de los cereales, en donde el ácido fítico puede estar a concentraciones de 2 a 5 g/Kg (Oberleas, 1973).

Se ha demostrado que el pan integral puede llegar a contener ácido fítico cuando no se usan levaduras para su elaboración, ya que estos organismos

poseen fitasas que se encargan de hidrolizar a los grupos fosfato (CFP, 1976; Griffins y Thomas, 1981).

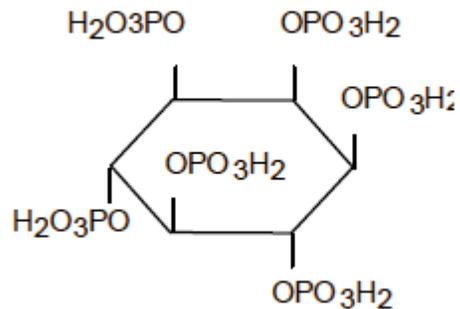


Fig 2 Mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6- hexafosfato o Ácido Fítico.

Fuente: Oberleas, 1973.

### 3.3.6. Inhibidores de amilasas

Son un tipo de proteínas lábiles al calor y pueden afectar la  $\alpha$ -amilasa salival, pancreática, así como a las bacterianas, el efecto de inhibición se destruye por la acción de enzimas proteolíticas del tracto digestivo, lo cual hace dudoso que tengan un significado antinutricional, ya que alguna vez se ha propuesto como un factor que impide utilizar a los almidones como fuente energética (Gudiseva-Chandrasekher, et al., 1981).

En realidad los inhibidores de amilasas (IA) han recibido poca atención, y donde se han usado con fines prácticos en individuos diabéticos, en forma encapsulada para evitar el ataque de las enzimas digestivas; sin embargo, en condiciones normales, es necesario inactivar estos factores antinutricionales; ya que pueden disminuir significativamente la digestión de polisacáridos.

Se encuentran en el endospermo de cereales y en el cotiledón de las leguminosas, se han estudiado más estos inhibidores en los cereales; sin embargo, también se ha reportado su presencia en otros alimentos, como son:

frijol, lenteja, garbanzo, papa y mango entre otros (Whitaker y Feeney, 1973; Mitjavila, 1990).

Con respecto a su acción antifisiológica se sabe que el mecanismo de acción en los humanos es la inhibición de la actividad de la amilasa intraduodenal, existen estudios que demostraron que el crecimiento de ratas wealing se veía retrasado al ser alimentadas con 20 y 40 mg de IA al día y que a concentraciones mas elevadas la digestión del almidón fue completamente inhibida, estos estudios fueron realizados con IA parcialmente purificados de frijol común (Pusztai et al., 1995).

Nuestra dieta comprende una compleja mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, las cuales no sólo nos proporcionan sustento sino que también pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo, modulación y prevención de enfermedades como el cáncer (Sugimura, 1995). Además como ya fue mencionado en los cereales y leguminosas existen de manera natural, compuestos antifisiológicos que en algunas circunstancias causan serias trastornos en la salud de los seres humanos y los animales.

### **3.4. GENOTOXICIDAD**

Tras numerosos estudios, hoy en día se acepta que los principales factores implicados en la aparición de cáncer en humanos están relacionados con el estilo de vida y la dieta (Gooderham et al., 1996), tal y como se muestra en la Tabla 10. El tabaco, que contribuye a un 30 % de los casos, especialmente los de pulmón aunque también los de páncreas, vejiga, riñones, cavidad bucal y esófago. Sin embargo, el factor de mayor contribución es la dieta, la cual se puede relacionar con el 35-45 % de los cánceres, especialmente los colorectales, los de páncreas, próstata, mama, ovario y endometrio, por supuesto, este hecho ha llevado a la necesidad de determinar cuáles son los agentes de la dieta responsables de la carcinogenicidad. La alimentación puede contribuir positivamente a la formación de tumores de dos maneras, por un lado, varios macrocomponentes de los

alimentos, como por ejemplo la grasa o el cloruro de sodio, pueden ayudar a la aparición de cáncer en el colon o en el estómago, respectivamente (Weisburger et al., 1995).

Tabla 9 Porcentajes aproximados de los factores implicados en la génesis de cáncer en seres humanos

Causas de cáncer	Porcentajes
Estilo de vida	70-80
Tabaco	~ 30
Dieta	35-45
Ocupacionales	< 10
Radiaciones	< 10
Criptogénicas (virus)	< 10

Fuente: Gooderham et al., 1996.

Por otro lado, en la dieta se encuentran un gran número de microcomponentes capaces de dañar el material genético celular, lo cual puede derivar en la formación de tumores tras un complejo proceso. Por supuesto, en los alimentos también se encuentran numerosas sustancias anticancerígenas que retrasan o dificultan la producción de toxinas, su interacción con el ácido desoxirribonucleico (ADN) o la progresión de las células malignas (Wakabayashi, et al., 1998).

Los compuestos genotóxicos presentes en la dieta pueden ser de origen natural, como las micotoxinas, pueden proceder de fuentes externas, como algunos pesticidas, aditivos, o bien se pueden formar durante el procesado de los alimentos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los N-nitrocompuestos y las aminas heterocíclicas, estos compuestos se transforman por la acción de enzimas celulares en metabolitos altamente electrofílicos capaces de interaccionar covalentemente con el material genético; compitiendo con este proceso de

activación, existen vías de detoxificación que convierten a los analitos en sustancias que son excretadas del organismo (Ferguson, 1999).

Algunas de las pruebas utilizadas para detectar el daño genético son el cariotipo, aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátides hermanas (ICH), el ensayo cometa, síntesis de ADN no programada, la prueba de Ames, Prueba de Micronúcleos (Madrigal, 2007).

### 3.4.1. Prueba de Micronúcleos

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear corresponden a material genético no incorporados correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la mitosis y posterior distribución de ADN por la exposición a agentes genotóxicos (Fig 3) (Zacalain, M. et al., 2005).

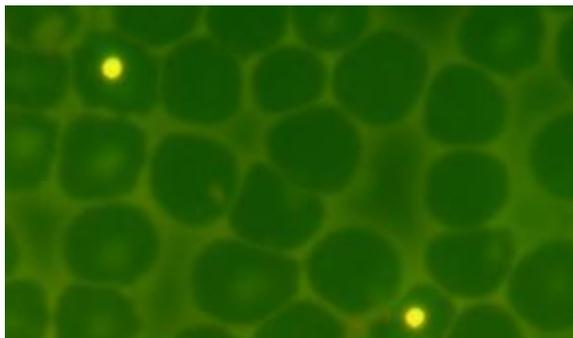


Fig 3 Eritrocitos Policromáticos Micronucleados

En la anafase cualquier fragmento cromosómico que no sea parte del centrómero no podrá integrarse a un núcleo por rezago anafásico durante la división celular. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados (que pueden ser fragmentos o cromosomas completos- quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y

una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios; tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, y de ahí su nombre de *micronúcleos* (figura 4) (Schmid, 1975).

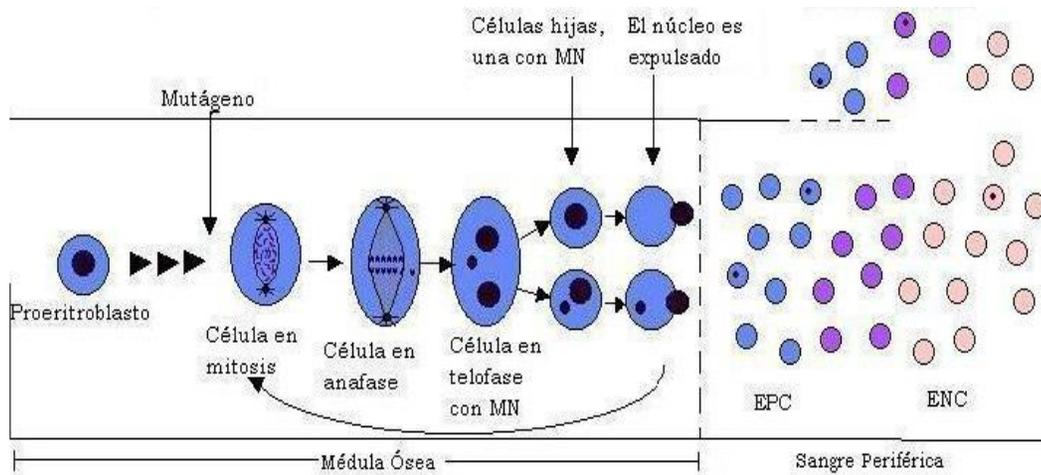


Fig 4 Formación de micronúcleo durante el proceso de eritropoyesis y su observación microscópica en sangre periférica. Fuente: Madrigal, et al., 2002.

La prueba de micronúcleos fue desarrollada por W. Schmid en 1975, quien originalmente la propuso para practicarse en la médula ósea del ratón para determinar el efecto genotóxico *in vivo*; posteriormente, la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos y especies, y en la actualidad se le utiliza ampliamente para determinar la genotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*. La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación, entre otros (Schmid, 1975).

Una manera sencilla para realizar la técnica es mediante el estudio de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica (propuesta en 1976 por W. Schmid un año después de haber hecho la misma técnica en médula ósea de ratón), pues una sola gota de sangre es suficiente para realizar los frotis; de esta manera, se

pueden contar los micronúcleos hallados en los eritrocitos policromáticos (EPC), para el caso de pruebas de 24 a 96 horas y en normocromáticos en estudios subcrónicos y crónicos (Schmid, 1975).

Los animales en general exhiben un número basal de micronúcleos espontáneos en sangre periférica, cercanas a cero; eso depende de la capacidad del sistema reticuloendotelial, principalmente el bazo, que es el encargado de retirar a los micronúcleos de la circulación; por tanto, de la eficiencia de este órgano depende la cantidad de micronúcleos que se puedan observar en la circulación. Se vuelve entonces de gran importancia reconocer especies que presenten micronúcleos espontáneamente, ya que, tal como se mencionó antes, en esas especies el control que ejerce el bazo es menor, y por consiguiente, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos, los micronúcleos se incrementan de manera significativa en sus eritrocitos; es por ello que los organismos con tales características pueden ser bioindicadores naturales (Torres, et al., 1999).

La prueba de micronúcleos permite detectar compuestos genotóxicos mediante el estudio comparativo de los EPCMN en sangre periférica de dichas especies, de esta manera, además de las especies de laboratorio –rata, ratón, hámster y algunos primates–, se han propuesto otros vertebrados no mamíferos, como ciertos anfibios, aves y peces, e incluso plantas en tejidos como las células formadoras del polen y los meristemos apicales de la raíz o el tallo (Zúñiga, et al., 2002).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El frijol forma parte en la alimentación diaria y desde el punto de vista nutricional es una fuente de proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos, se sabe que presenta un contenido relevante de proteínas siendo esta un aporte considerable a la nutrición del mexicano. En cuanto al amaranto, se ha ampliado su mercado de consumo en países industrializados como Estados Unidos, Japón y Alemania, en México el consumo de alimentos procesados con amaranto ha sido principalmente en el ramo naturista, sin embargo se ha constatado la presencia de productos destinados al mercado masivo.

Debido a que el hombre se encuentra en constante contacto con agentes tóxicos de origen sintético o natural, las pruebas para detectar agentes que dañan al ADN son de gran importancia, pues los compuestos genotóxicos tienen la capacidad de alterar el material genético en los organismos, incluido el hombre, y además pueden tener efectos teratogénicos, causar mutaciones en las células germinales, inducir enfermedades cardiacas, influir en los procesos de envejecimiento y generar mutaciones en las células somáticas que pueden contribuir al desarrollo del cáncer. En algunos estudios se ha demostrado la presencia de compuestos genotóxicos en los alimentos tales como pesticidas, aromáticos policíclicos, N-nitroso-compuestos, micotoxinas, colorantes.

Estudios *in vivo* realizado a leguminosas, como es el frijol tépari blanco han demostrado la toxicidad de compuestos de tipo proteico como lo son las lectinas, al ser aislados y purificados resultaron ser moderadamente tóxicos en ratones macho y hembra de la cepa CD1<sup>+</sup>. Con respecto al amaranto no se han reportado ningún tipo de estudio acerca de la toxicidad de compuestos de carácter proteico; por este motivo nos dimos a la tarea de estudiar los extractos proteicos del frijol tépari blanco (*Phaseolus acutifolius* var. *Latifolius*) y del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) con el objetivo de conocer si provoca daño genotóxico y citotóxico *in vivo* específicamente en ratones de la cepa CD1<sup>+</sup>, mediante la aplicación de la técnica de micronúcleos *in vivo*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la genotoxicidad de extractos proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y frijol tépari blanco (*Phaseolus acutifolius var. Latifolius*) por medio de la prueba de micronúcleos *in vivo*.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos proteicos a partir de semillas amaranto y frijol sin ningún tratamiento previo a la molienda.
- Determinar la concentración de proteína soluble presente en los extractos aplicando el método de Lowry.
- Determinar la presencia de lectina disuelta en los extractos proteicos mediante la técnica de diluciones seriadas por el método de Jaffé.
- Determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de los extractos proteicos en ratones de la cepa CD1+ mediante el método de Lorke.
- Realizar el conteo de EPCMN en 1000 EPC y EPC en 1000 ET, como índice de genotoxicidad y citotoxicidad, respectivamente, de los extractos de amaranto y frijol tépari blanco.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Semillas de amaranto de los Estados de México., Puebla, tres del Estado Hidalgo.  
(Progreso, y dos variedades de Mixquiahuala)

Semillas frijol tépari blanco

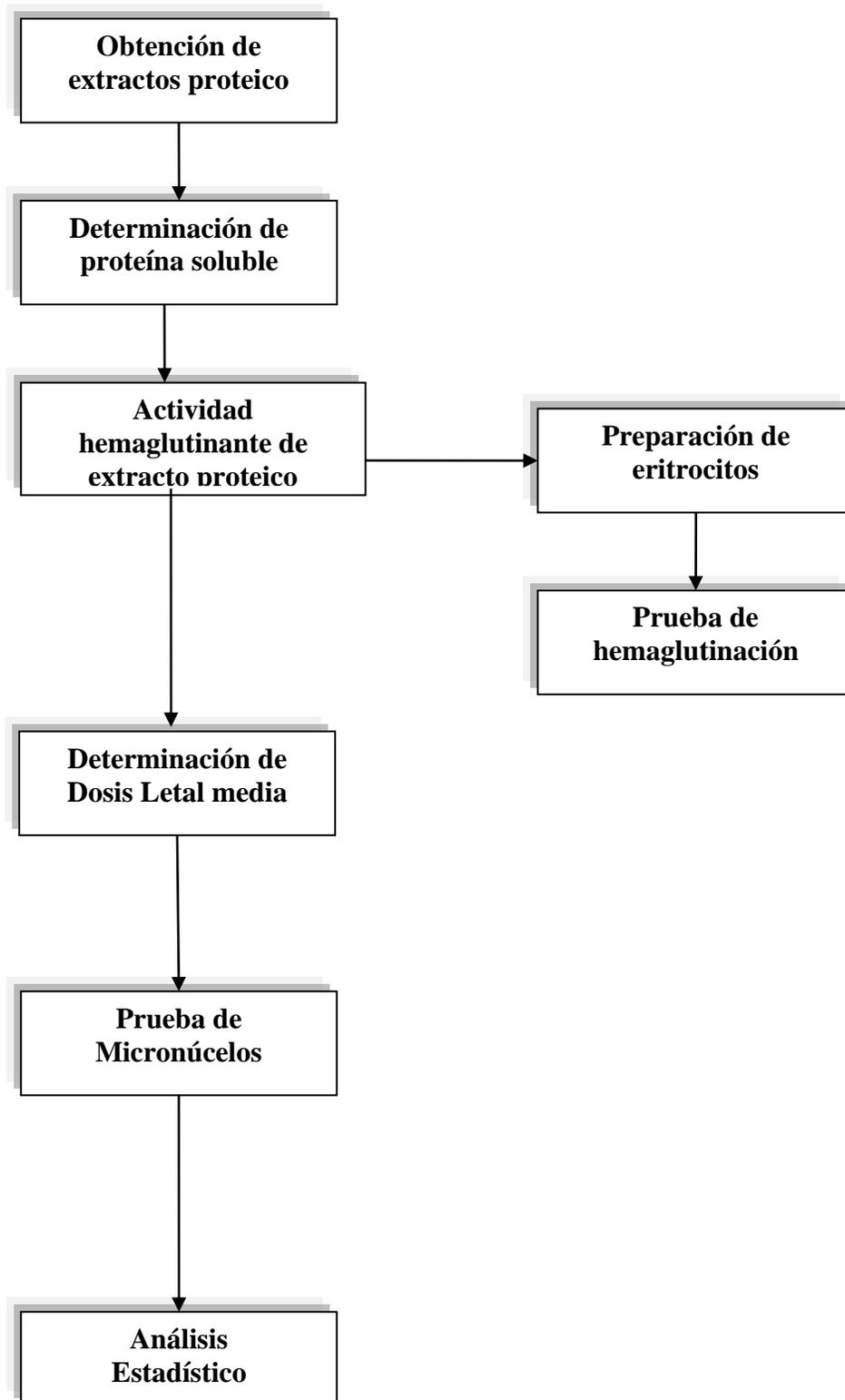
Eritrocitos humanos tipo A<sup>+</sup>

85 ratones macho de la cepa CD1+

### 6.1.2. REACTIVOS

REACTIVOS	MARCA
Fosfato Monobásico de Sodio	J.T. Baker
Fosfato Dibásico de Sodio	J.T. Baker
EDTA, sal disódica	Reasol
Cloruro de Sodio	J.T. Baker
Carbonato de Calcio	J.T. Baker
Sulfato del Cobre	J.T. Baker
Citrato de Sodio	J.T. Baker
Reactivo de Follin	Sigma-Aldrich
Seroalbumina bovina	Sigma-Aldrich
Daunorrubicina	Rubilem de Laboratorios Lemery
Giemsa	Merk

## 6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL



## **6.3. MÉTODOS**

### **6.3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS**

Para la obtención de los extractos fue necesaria la molienda del grano en un molino, sin ningún tipo de tratamiento previo, tanto del frijol como del amaranto. Una vez teniendo la harina, se realizó una solución 1:10 (W/V) de harina- Buffer Fosfato Salino (PBS) o NaCl 0.85%, se agitó durante 16 h a 4° C, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 45 min a 4° C. el precipitado fue desechado y el concentrado proteico correspondiente a extractos totales fueron liofilizados.

### **6.3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE**

La determinación de proteína soluble que se realizó a los extractos proteicos de las semillas de amaranto y semillas de frijol blanco fue mediante la técnica de Lowry, et al., 1951.

En un tubo de ensayo se mezclaron 5 µL de muestra y 455 µL de NaCl al 0.85% o PBS más 500 µL (NaOH 0.1N) dejando reposar 30 min., una vez pasado el tiempo se adicionaron 2500 µL de solución Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-CuSO<sub>4</sub> (50 partes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en H<sub>2</sub>O más 1 parte de CuSO<sub>4</sub>) dejando incubar 10min temperatura ambiente y por último 250 µL de reactivo de Follin en relación 1:3 en H<sub>2</sub>O dejando reaccionar durante 45 min a temperatura ambiente posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de UV visible (Perkin-Elmer) a una longitud de onda de 750 nm. Se realizó una curva de calibración empleando como estándar seroalbúmina bovina.

### **6.3.3. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS PROTEICOS**

#### **6.3.3.1. Preparación de eritrocitos**

Para este fin se utilizó sangre humana de tipo A+ la cual fue colectada en tubos con EDTA al 2% como anticoagulante, fue homogenizada la mezcla con movimientos suaves y cuidadosos, posteriormente se centrifugó el tubo a 3000 rpm durante 15 min, con el objetivo de separar los eritrocitos del plasma. El

paquete celular fue lavado tres veces con PBS y resuspendido en PBS a una concentración del 2%.

#### 6.3.3.2. Prueba de hemaglutinación

Para esta prueba se utilizó el método de diluciones seriadas con una solución de eritrocitos descrita por Jaffé en 1980.

La hemaglutinación se realizó en placas de 96 micropozos, a cada pozo fue agregado 50  $\mu$ L del extracto total y se efectuaron diluciones seriadas de orden 2 con PBS o NaCl al 0.85%, según fue el caso, subsiguiente a esto se adicionó a cada pozo 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos, se homogenizó con movimientos circulares suaves, se dejó incubar temperatura ambiente durante una hora y se observó el último pozo donde hubo aglutinación, para obtener con esto el título de aglutinación.

La actividad específica del extracto se calculó dividiendo el título (se expresa con una fórmula matemática,  $\text{Título} = 2^n$ , n: es el último pozo que presentó aglutinación), entre los miligramos de proteína soluble presentes en 50  $\mu$ L de la muestra.

#### 6.3.4. PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

##### 6.3.4.1. Determinación de Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>)

Esta determinación se realizó según el método de Lorke en 1983; se hicieron lotes de 3 ratones para cada dosis administrada, en la primera y segunda etapa del estudio.

##### 6.3.4.1.1. Primera etapa

Fueron administrados los extractos a concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/Kg de peso de ratón vía intraperitoneal y fueron observados las durante 7 días, y se procedió a registrar peso antes y cada tercer día después de la administración.

#### 6.3.4.1.2. Segunda etapa

Para esta etapa se realizaron administraciones de extracto proteico vía intraperitoneal a concentraciones más elevadas, la cuales fueron de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg de peso de ratón; al igual que en la etapa anterior se registra peso y signos de toxicidad durante 7 días.

Para obtener la concentración de la DL<sub>50</sub> es necesario utilizar la media geométrica entre la dosis donde hubo muertes y el valor bajo consecutivo donde no las hubo, mediante la siguiente fórmula

$$G = \sqrt[2]{(X_1 * X_2)}$$

Donde:

G: Media geométrica

X<sub>1</sub>: Primera dosis donde hubo muerte

X<sub>2</sub>: Dosis baja consecutiva donde no hubo muerte

#### 6.3.4.2. Prueba de Micronúcleos

Se emplearon 35 ratones, se pesaron, marcaron y separaron aleatoriamente en lotes de 5 ratones, se les tomó una muestra de sangre periférica obtenida del corte en la porción terminal del ratón, se hizo un frotis sanguíneo se dejó secar y se etiquetó como T0.

Se procedió a la administración de extractos proteicos a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/Kg, solución salina fisiológica (0.9%) y para la DAU la dosis administrada fue de 3mg/Kg de ratón vía intraperitoneal; a las 24, 48, 72 y 96 h de administración se realizaron frotis de sangre periférica, las cuales fueron etiquetadas con el número de ratón, número de muestra, dosis y tiempo de muestreo, conjuntamente con la toma de muestra fueron registrados los pesos de los ratones a los tiempos correspondientes.

Los frotis sanguíneos se fijaron sumergiéndolos en metanol absoluto en un vaso de copplin durante 5 minutos, una vez fijadas las laminilla se realizó la tinción

empleando colorante Giemsa en solución reguladora de fosfatos a pH 6.8, durante 10 minutos, se dejaron secar observaron en el microscopio y se leyeron con un objetivo de 100x.

Para la determinación de la citotoxicidad se cuantificaron en 1000 eritrocitos totales (ET) el número de eritrocitos policromáticos (EPC) y para la determinación del efecto genotóxico fue necesario cuantificar en 1000 eritrocitos policromáticos la cantidad de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN), es decir en los EPC la presencia de corpúsculos pequeños, redondos y bien definidos con una coloración púrpuras.

#### 6.3.5. Análisis estadístico

Para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de los valores obtenidos del conteo de EPC y EPCMN se realizó mediante una ANOVA y la prueba de Tukey con una  $p < 0.05$ , utilizando un software *GraphPad InStat 3.0*.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1. Cuantificación de proteína soluble

Se ha demostrado que las fitohemaglutininas, son solubles en soluciones salinas por ser compuestos de carácter proteico, es por ello que se determinó la concentración de proteínas solubles.

Según la técnica de Lowry se realiza una curva de calibración para la determinación de proteínas solubles en la muestra problema, esto se hizo utilizando seroalbúmina bovina como estándar; en la figura 5 se muestra la curva de calibración para la cuantificación de proteína en mg/mL de los extractos proteicos tanto de amaranto como para el frijol.

En la figura 6 se observa que la concentración de proteínas más alta es la que se obtuvo del frijol negro 5.51 mg/mL con PBS y 5.35 mg/mL con NaCl; el frijol flor de mayo obtuvo cantidades de proteínas de 4.06 mg/mL con PBS y 1.34 mg/mL con NaCl, y para el frijol tépari blanco se obtuvieron concentraciones de 3.79 mg/mL en PBS y 3.87 mg/mL NaCl. Las concentraciones de proteínas de frijol tépari, representan una diferencia mínima con respecto al frijol flor de mayo, con PBS como medio de disolución, además de que la concentración de proteínas del tépari es mucho mayor a comparación con el frijol flor de mayo al ser disueltos en NaCl.

En el caso del amaranto encontramos que la extracción de proteína con PBS se obtuvieron altos niveles de proteína soluble en las cinco especies, la mayor concentración fue la del amaranto de Mixquiahuala I con 2.67 mg/mL y la que tuvo menor cantidad fue el amaranto de Puebla con 1.68 mg/mL utilizando PBS, sin embargo, la menor concentración de proteína extraída fue la de la semilla de amaranto de Mixquiahuala I al ser tratado con NaCl, por otro lado la muestra que contiene mayor cantidad de proteína disuelta es el amaranto de Progreso con una concentración de 1.70 mg/mL seguida del amaranto de Mixquiahuala II de 1.51 mg/mL.

De acuerdo con los resultados obtenidos encontramos que en algunos casos existen diferencias entre la concentración de proteína extraída con solución de NaCl y PBS, esto puede deberse a que la solución de PBS salino tiene la propiedad de mantener constante el pH de una solución y que como ya es sabido los solutos disueltos en una solución pueden alterar el pH, esto es lo que probablemente sucedió en la solución de NaCl y así alterar la estructura tridimensional de las proteínas disueltas en los extractos dando como resultado una baja concentración de proteínas cuantificables, por eso es recomendable utilizar soluciones salinas amortiguadas.

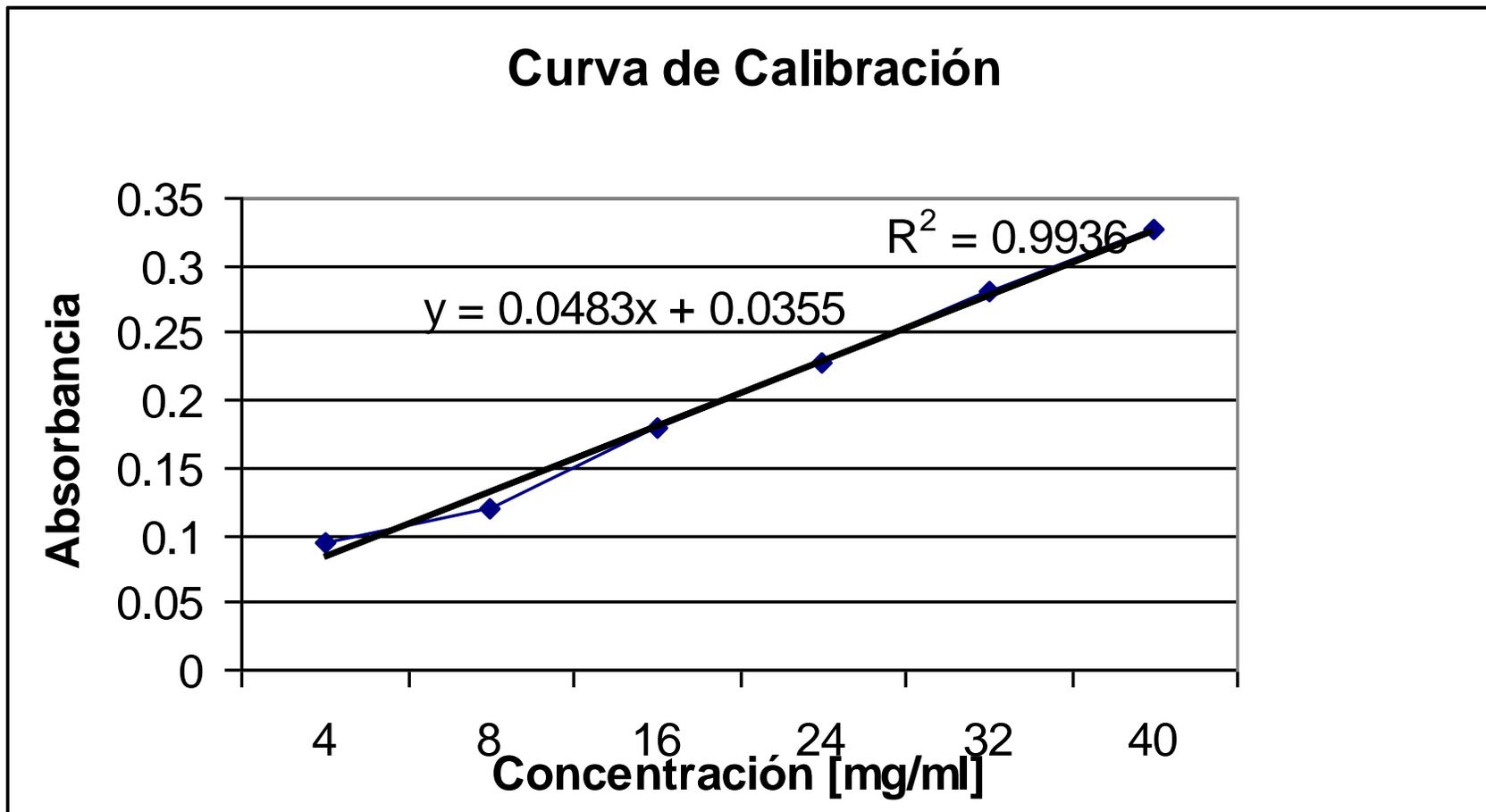
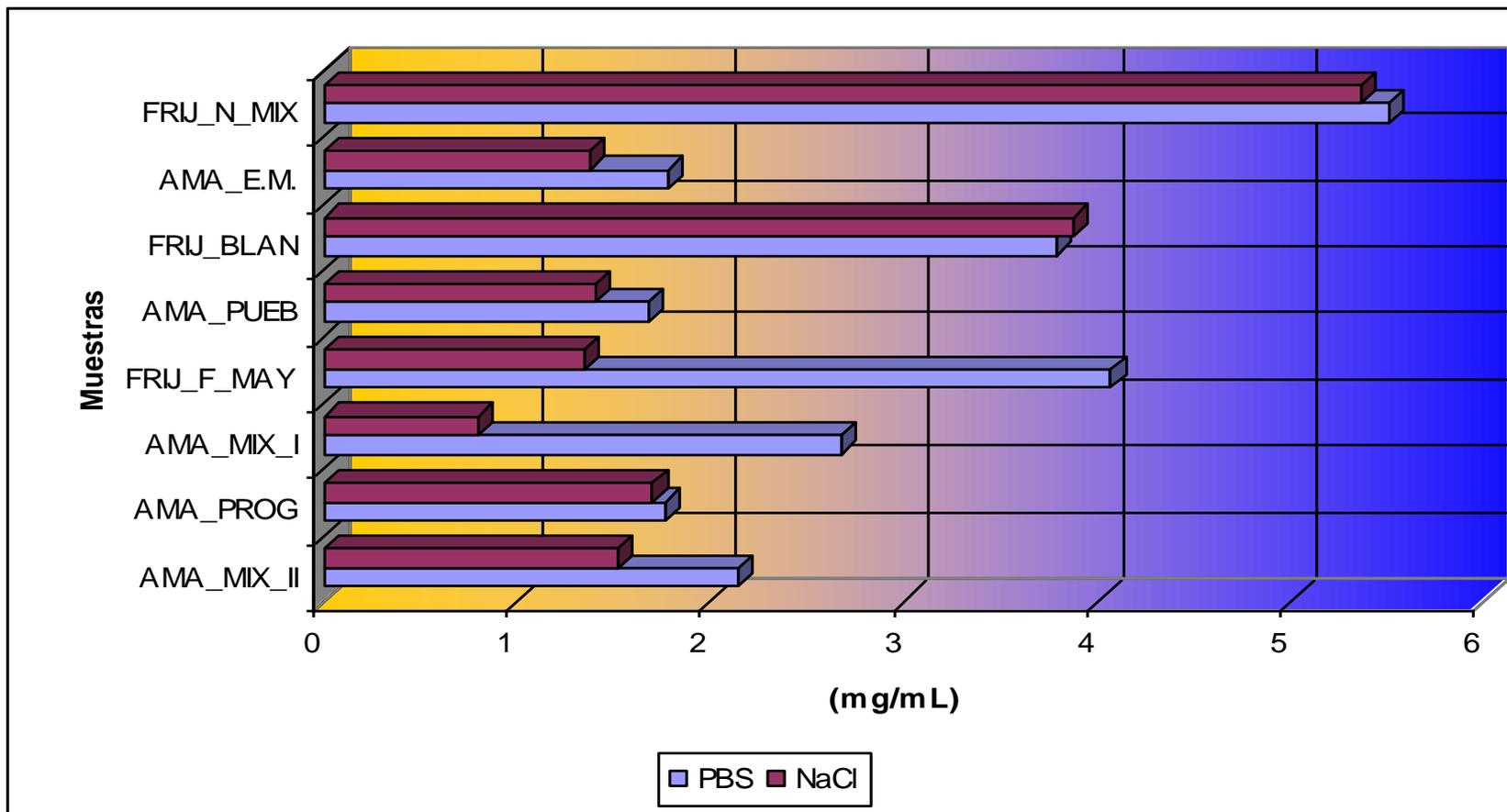


Fig 5 Curva de calibración para la determinación de proteína soluble mediante la técnica de Lowry



**Fig 6 Concentración de proteína soluble de extractos proteicos.**

**FRIJ\_N\_MIX:** frijol negro de Mixquiahuala; **AMA\_E.M.:** amaranto del Estado de México; **FRIJ\_BLAN:** frijol blanco (tépari); **AMA\_PUEB:** amaranto del Puebla; **FRIJ\_F\_MAY:** frijol flor de mayo; **AMA\_MIX\_I:** amaranto Mixquiahuala 1; **AMA\_PROG.:** amaranto de Progreso; **AMA\_MIX\_II:** amaranto de Mixquiahuala 2.

## 7.2. Actividad Hemaglutinante de extractos proteicos.

Esta prueba se hizo con el objetivo de determinar la presencia de lectinas en los extractos proteicos, para tal fin, se utilizaron eritrocitos humanos tipo A<sup>+</sup>, purificados del según lo reportado por Jaffé en 1980. No se descarta la posibilidad de encontrar concentraciones de otro tipo de compuestos tóxicos naturales disueltos en los extractos proteicos, como lo son los inhibidores de tripsinas, taninos, saponinas, ácido fítico entre otros, cabe mencionar que para obtener concentraciones elevadas de estos es necesario contar con otras condiciones como lo son medios alcalinos, solventes orgánicos, temperaturas controladas.

De este modo analizando los resultados de Título de hemaglutinación graficados en la figura 7, se observó que la muestra de frijol tépari blanco disuelta con PBS presentó un título de 512 que según los resultados es la muestra con título mas bajo en comparación con las otras especies de frijol, sin embargo se observó que cuando la muestra fue diluida con NaCl el título fue de 645.08, mayor al que se obtuvo en el tratamiento con PBS. Para el caso del amaranto la muestra que obtuvo mayor título cuando fue disuelta con NaCl fue la de Mixquiahuala II con un título de 512 y al extraerse con PBS resultó ser una de las que menor título reportó 256, a diferencia de la muestra de amaranto de progreso que el título respetado fue de 512.

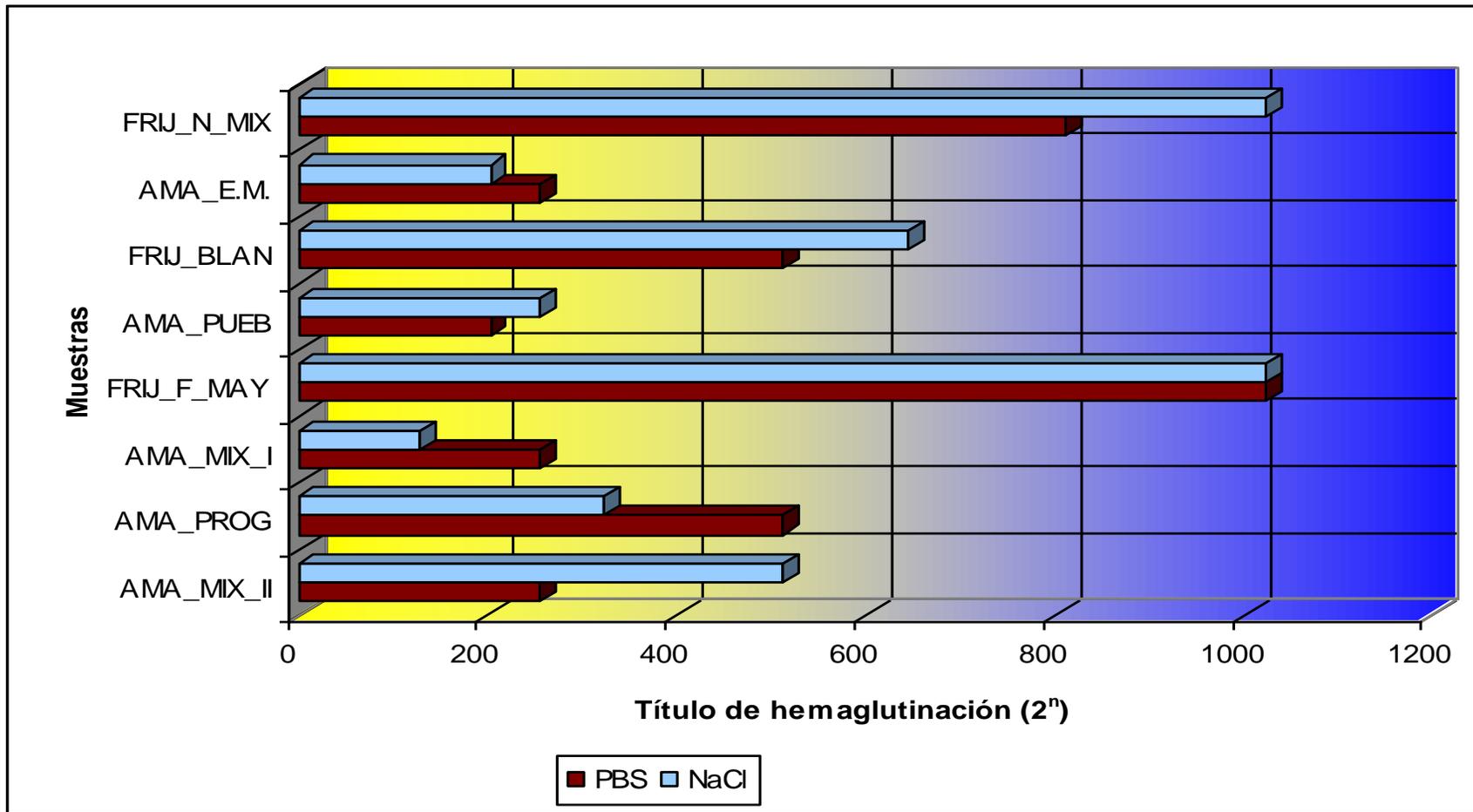
Salgado en 2006, determinó la actividad específica de las lectinas de los extractos proteicos del amaranto y de frijol común y observó que los extractos de amaranto eran más afines cuando se realizó pruebas de hemaglutinación con eritrocitos humanos tipo A<sup>+</sup> y que de los extractos proteicos de frijol común era más afines a eritrocitos humanos tipo O<sup>+</sup>. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, todas las diferencias de actividad hemaglutinante pudo deberse a que la afinidad de la lectina fue mayor o menor según la capacidad de reconocimiento de carbohidratos presentes en las membranas extracelulares de los eritrocitos (Rodríguez et al., 2004). La aglutinación producida por las lectinas

en los tres grupos diferentes sanguíneos podría ser explicada por el hecho de que el gen H (unidad fundamental de la herencia que codifica la producción de la enzima fucosiltransferasa), que es capaz de colocar fucosa en el azúcar terminal, formándose la sustancia H, la cual consiste en la unión de cinco azúcares, cuya secuencia es: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, galactosa. Esta sustancia H es común para todos los azúcares presentes en la membrana de los eritrocitos del sistema ABO (H), diferenciándose en la presencia de azúcares en la galactosa terminal. En el grupo A la sustancia H presenta adición de un N-acetilgalactosamina y el grupo B una galactosa, mientras que los eritrocitos del grupo sanguíneo O no presentan adición de azúcares en la sustancia H (Salgado, 2006).

Además se puede notar que la actividad hemaglutinante de los extractos proteico fue mayor en salina al 0.85% en comparación con obtenida en PBS, debido a que posiblemente la concentración de metabolitos en la solución de PBS es mayor que en la solución de NaCl, interfiriendo con la interacción de eritrocito-lectina.

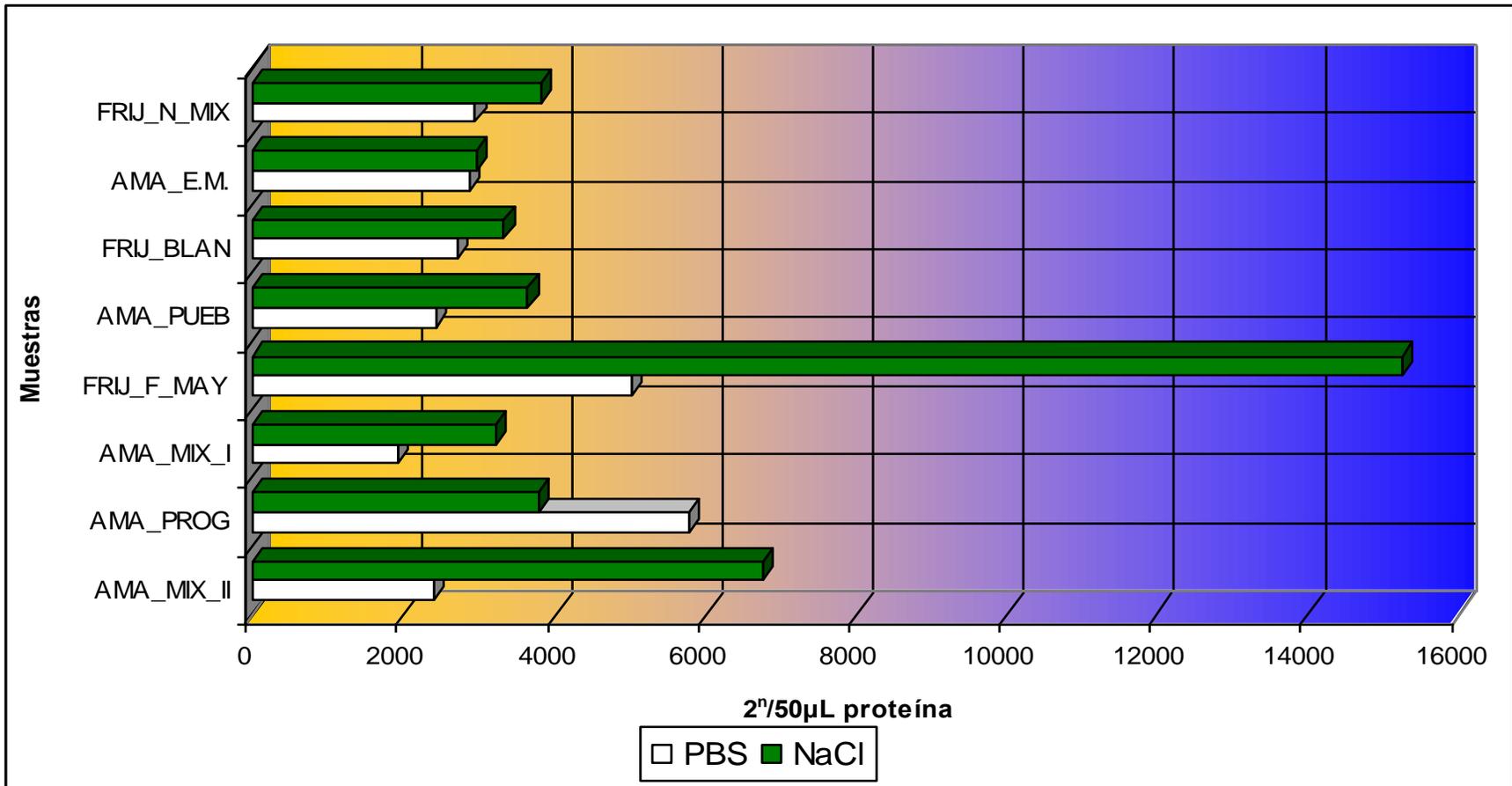
Una vez que se calcularon las concentraciones de proteína soluble de los extractos proteicos y a su vez el título de las hemaglutinaciones podemos determinar la actividad específica de la lectina en cada uno de los extractos.

Al analizar los resultados de la figura 8 se observa que la actividad específica del amaranto de Mixquiahuala II fue elevada con respecto a las otras 4 especies obteniendo así una actividad específica de 6759.79 TA/mg cuando se utilizó NaCl 0.85%, cuando se utilizó PBS la actividad fue de 2389.33 TA/mg. La actividad específica del frijol tépari blanco en el caso de ser diluida con NaCl fue de 3339.26 TA/mg; muy inferior a la de la muestra de frijol flor de mayo con 15257.33 TA/mg; cuando la muestra de tépari fue tratada con PBS la actividad específica fue de 2700.23TA/mg.



**Fig 7 Título de hemaglutinación de extractos proteicos**

**FRIJ\_N\_MIX:** frijol negro de Mixquiahuala; **AMA\_E.M.:** amaranto del Estado de México; **FRIJ\_BLAN:** frijol blanco (Tépari); **AMA\_PUEB:** amaranto del Puebla; **FRIJ\_F\_MAY:** frijol flor de mayo; **AMA\_MIX\_I:** amaranto Mixquiahuala 1; **AMA\_PROG.:** amaranto de Progreso; **AMA\_MIX\_II:** amaranto de Mixquiahuala 2.



**Fig 8 Actividad específica de lectinas de extractos proteicos**

**FRIJ\_N\_MIX:** frijol negro de Mixquiahuala; **AMA\_E.M.:** amaranto del Estado de México; **FRIJ\_BLAN:** frijol blanco (Tépari); **AMA\_PUEB:** amaranto del Puebla; **FRIJ\_F\_MAY:** frijol flor de mayo; **AMA\_MIX\_I:** amaranto Mixquiahuala 1; **AMA\_PROG.:** amaranto de Progreso; **AMA\_MIX\_II:** amaranto de Mixquiahuala.

Estos resultado se utilizaron con el fin de seleccionar una semilla de amaranto y una semilla de frijol y así evaluar el daño genotóxico y citotóxico *in vivo* específicamente en ratones de la cepa CD1+, mediante la aplicación de la técnica de micronúcleos *in vivo*, los extractos proteicos de amaranto de Mixquiahuala II fueron seleccionados por tener la mejor actividad específica en comparación con las otros 4 especies estudiadas y los extractos proteicos del frijol tépari por que su actividad específica fue buena al ser comparada con la especie de frijol negro de Mixquiahuala de la especie *Phaseolus vulgaris*, especie que ha sido estudiada con anterioridad por Salgado-Telpalo en 2006 y por Valadez-Vega en 2005, además de que la especie del frijol tépari blanco ha sido muy poco estudiada.

### 7.3. Determinación de Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>) de los extractos proteicos

Para la determinación de la DL<sub>50</sub> de amaranto y frijol fue necesaria la liofilización de los extractos proteicos, y administrar las concentraciones de acuerdo al método de Lorke (1983).

Para el caso del frijol tépari blanco, en este estudio, no fue aparentemente tóxico hasta con 5000 mg/Kg debido a que no hubo muerte con ninguna concentración administrada. Reynoso-Camacho, et al., en el 2003 reportaron que las DL<sub>50</sub> de las lectinas purificadas del frijol tépari blanco fueron de 1100 mg/Kg de peso de ratón (macho) y 1120 mg/Kg de peso de ratón (hembra), cepa CD1+. A diferencia del estudio reportado en el 2003, en este estudio las lectinas administradas se encontraban disueltas simultáneamente con otros compuestos como lo pueden ser fibras solubles, minerales, vitaminas hidrosolubles, que pudieron haber disminuido la toxicidad de la lectina presente en los extractos proteicos. Valadez-Vega en 1993 realizó un estudio de la citotoxicidad de extractos proteicos y lectinas purificadas de varias líneas de frijol tépari y frijol común, el extracto proteico de frijol común fue el que causó el mayor daño sobre la viabilidad de las células epiteliales libres en comparación con los extractos

proteicos de frijol tépari, además de que no se observó gran diferencia entre los extractos proteicos y las lectinas puras sobre el número total de células epiteliales, con esto se puede comprobar que los extractos de frijol tépari blanco no representan gran riesgo toxicológico.

La concentración de la  $DL_{50}$  para el extracto de amaranto fue de 1254.9 mg/Kg resultando ser moderadamente tóxico; este resultado pudo deberse a que, a diferencia del frijol, la toxicidad de las proteínas, como las lectinas, disueltas en los extractos del amaranto es mayor con respecto de las proteínas del frijol además de que la mayoría de las proteínas disueltas en los extractos de frijol tépari son albúminas y globulinas (Valadez-Vega, 1993).

Es importante hacer hincapié que las lectinas no son los únicos compuestos antifisiológicos que pudieron haber sido extraídos con la solución de NaCl, los extractos pueden presentar saponinas, taninos, inhibidores de tripsina, ácido fítico que pudiera ser que estén actuando sinérgicamente con los compuestos de carácter proteico como lo son las lectinas sobre el organismo, para causar efectos tóxicos (Cruz, 2001). Al respecto no se ha encontrado evidencias en la literatura de dicha interacción por lo que es necesario investigar y realizar estudios para corroborar los resultados anteriores.

Es de gran importancia poner atención sobre estos datos debido a que en las últimas décadas el consumo de amaranto ha ido incrementando, por ejemplo las galletas y panes adicionados con harina de amaranto crudo, son un alimento hipoalergénico para los que padecen intolerancia al gluten, y no pueden consumir panificados a base de harina de trigo, además de que en México su principal consumo es en productos naturistas, con esto se incrementa el riesgo intoxicación por consumo de amaranto sin ningún tratamiento térmico previo a su consumo.

## 7.4. Evaluación Genotóxica y Citotóxica

### 7.4.1. *Phaseolus acutifolius* var. *Latifolius*

En la figura 9 se observa la evaluación del efecto genotóxico de los extractos del frijol tépari blanco y los efectos genotóxicos de la daunorrubicina (DAU), utilizado como control positivo, solución salina fisiológica de NaCl al 0.85% en este estudio fue utilizada como testigo negativo. Como se esperaba, el lote de ratones administrados con la solución testigo negativo indicó ausencia de genotoxicidad, con una media de 1.6, 1.8, 2.4, 2 del conteo de EPCMN a las 24, 48, 72, 96 h, respectivamente; sin embargo, la DAU reportó un aumento de la cantidad de EPCMN a partir de las 24 h con una media de 28.6, a las 48 h se obtuvo el mayor efecto genotóxico aumentando 33.5 veces la cantidad de EPCMN con respecto al testigo negativo, manteniéndose la genotoxicidad hasta las 96 h, disminuyendo considerablemente el número de EPCMN con una media de 14.2, 4.7 veces menor con respecto al pico máximo; cabe mencionar que los resultados del ensayo genotóxico de la DAU que se observaron concuerdan con los que se obtuvieron por Álvarez-González, et al., en el 2004, que indican que la DAU es un agente inductor de la producción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en sangre periférica de ratón.

Los resultados de las medias del número de EPCMN obtenidos de los extractos proteicos de frijol tépari blanco que presentaron daño genotóxico fueron de 5.75 para 250 mg/Kg, 6.25 para 500mg/Kg y 1000 mg/Kg a las 48 h de administración; en los tiempos posteriores el número de EPCMN disminuyó a tal grado que no hubo ningún daño genotóxico. En el 2003 se realizó un estudio sobre la genotoxicidad de la semilla de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con ratones macho de la cepa Swiss, utilizando la técnica de micronúcleos en células de médula ósea, los ratones fueron alimentados con una dieta del 20% de frijol negro y no hubo incremento de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en médula ósea (Azevedo, 2003), con este reporte se puede

suponer que en la composición química de la semilla íntegra del frijol también existen sustancias que actúan como quimio-protectores, es por ello que en este estudio al obtener los extractos proteicos algunos de los compuestos presentes en la semilla entera que tiene la capacidad de actuar como agentes antimutagénicos y que no fueron extraídos por la solución salina; los polifenoles pudieron ser uno de éstos debido a que son compuestos no polares necesitan solventes orgánicos - como el metanol-, para su completa extracción (Valadez-Vega, 2005).

En la figura 10 se pueden observar los resultados de la evaluación citotóxica de la DAU obtenido un aumento de la cantidad de EPC, con una media de 34.8 a las 96 h; la solución salina no tuvo ningún efecto manteniendo la media de 14 EPC durante todo el estudio. El extracto de frijol tuvo un efecto estimulador de la eritropoyesis a partir de las 24 h manteniendo su efecto hasta las 96 h, donde la mayor el mayor efecto fue obtenida a las 48 con 250 mg/Kg 4 veces mayor al testigo negativo y a las 72 h con una dosis 500 mg/Kg 4.2 veces mayor al testigo negativo. Como se ha visto los extractos proteicos del frijol *Phaseolus acutifolius var. Latifolius* presenta menor citotoxicidad con respecto a otros tipos de frijol como lo es el *Phaseolus vulgaris*, es por eso que no representa gran riesgo toxicológico para quien lo consume (Valadez-Vega, et al., 2005). En otros estudios se ha encontrado que algunas lectinas pueden presentar efecto mitogénico *in vitro* (Bernaldo, 1998), debido a esto pudo deberse el aumento EPC al estimular la eritropoyesis.

#### 7.4.2. *Amaranthus hypochondriacus*

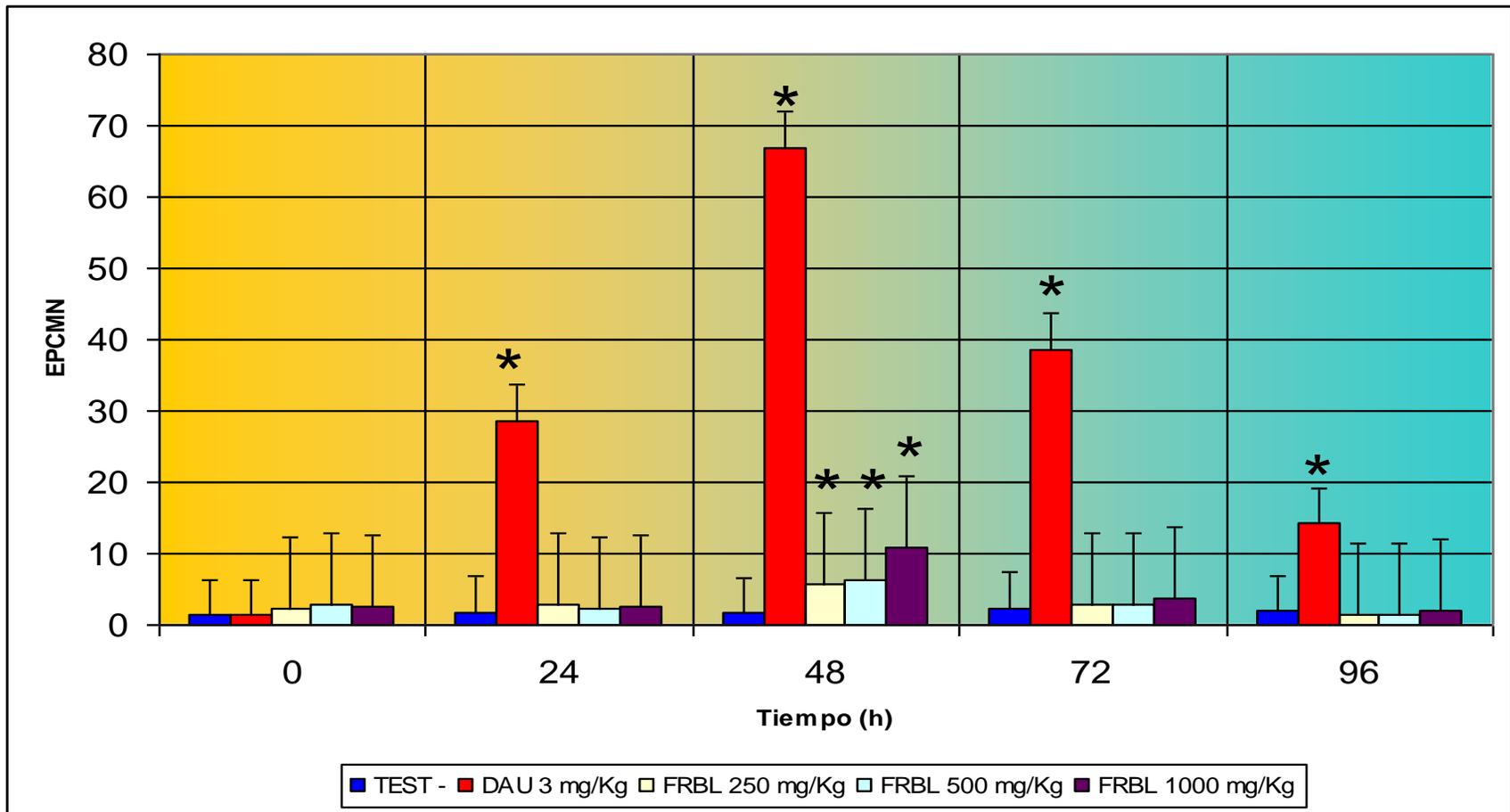
Los resultados que se obtuvieron de la evaluación genotóxica del extracto proteico del amaranto se pueden observar en la figura 11, la cantidad de EPCMN a concentraciones de 50, 150 mg/Kg no presentaron diferencias estadísticas significativas comparadas con el testigo negativo, en ninguno de los tiempos de toma de muestra y con esto no se observa daño genotóxico. Por otra parte la

dosis de 250 mg/Kg fue en la única que se obtuvo efecto genotóxico, induciendo la producción de EPCMN, las medias fueron de 8.25, 22.25 y 25.22; 4.2, 11.13, 18 veces mayor al testigo negativo a partir de 48 72 y 96 h respectivamente, observándose un comportamiento dosis-dependiente.

Para el caso del amaranto no se han reportado estudios de la toxicidad sobre el material genético, es por ello que se puede suponer que los compuestos de carácter proteicos extraídos con solución salina como las lectinas, inhibidores de tripsina, inhibidores de amilasas, fitatos, saponinas, entre otros, son compuestos que pudieran tener alguna propiedad genotóxica en ratones.

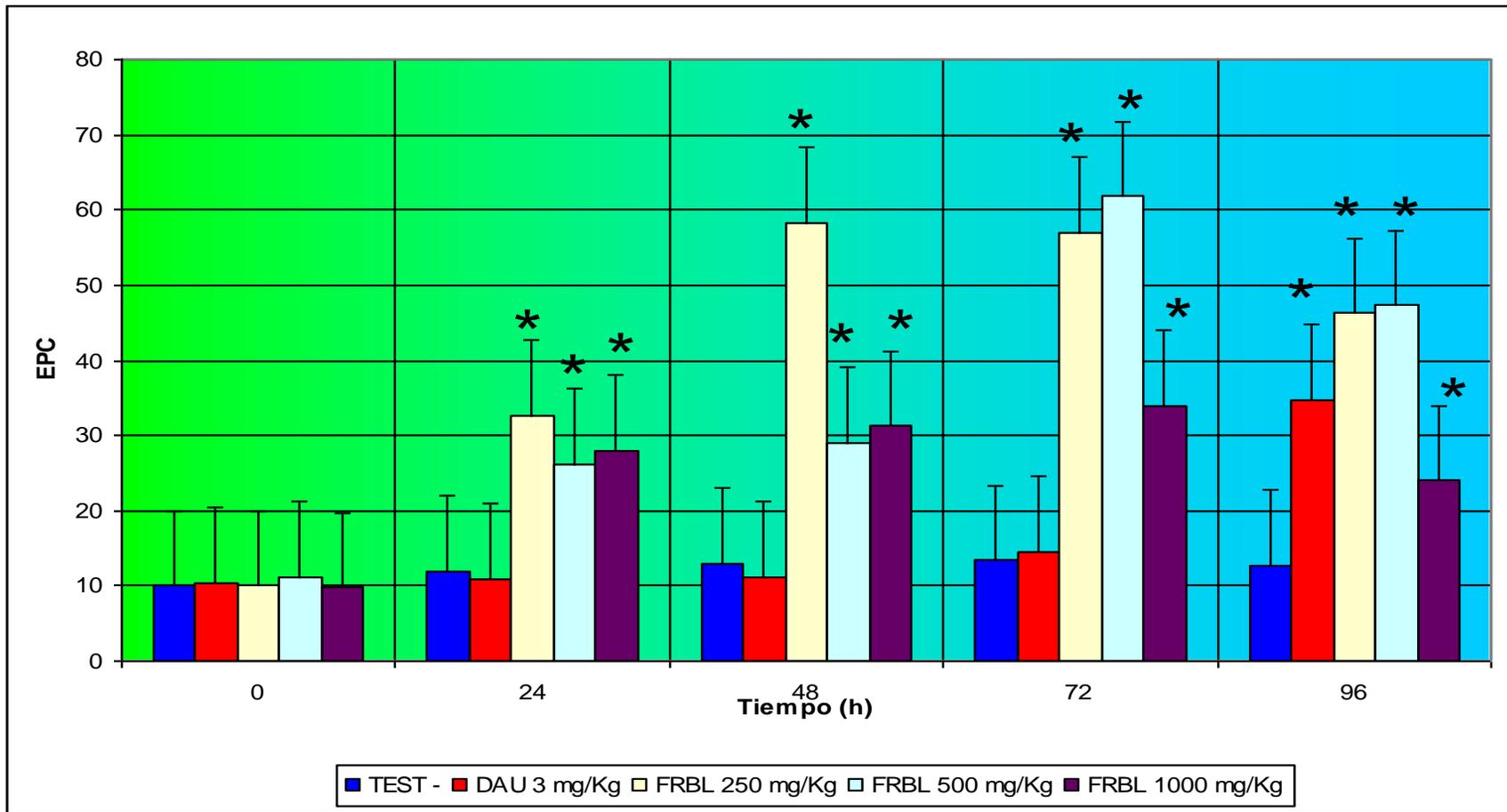
En la figura 12 se reportan los resultados de la evaluación del efecto citotóxico del control positivo, donde el aumento de la eritropoyesis se obtuvo hasta la 96 h; para el caso del amaranto se encontró que la cantidad de EPC de todas las dosis administradas a partir de las 24 hasta las 96 h, de toma de muestra, presentaron diferencia estadísticamente significativa a comparación con el testigo negativo, con esto se pudo decir que hubo un aumento significativo de la eritropoyesis que a su vez se puede interpretar como citotóxico. Se puede interpretar los resultados como daño citotóxico del amaranto debido a que los extractos proteicos resultaron moderadamente tóxicos en este mismo estudio, la estimulación de la eritropoyesis pudo deberse a un posible aglutinación intraperitoneal e intravascular producido por la propiedad que tienen las lectinas de aglutinar eritrocitos, con la consiguiente disminución de aporte de oxígeno y daño tisular ya que se ha demostrado que tiene cierta capacidad de inhibición *in vitro* en células epiteliales de intestino delgado de rata (Valadez-Vega, et al., 2005), además de que al ser ingeridas las lectinas vía oral pueden producir una intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema, es decir que reaccionan con las criptas y vellos intestinales, pero en diferente región de acuerdo a la especificidad de la hemaglutinina, lo que ocasiona una interferencia no-específica con la absorción de los nutrimentos, por

consiguiente hay un efecto drástico en la nutrición del organismo que las ingiere (Bernaldo, 1998).



**Fig 9 Efecto genotóxico de extractos proteicos de *Phaseolus acutifolius* var. *Latifolius* en sangre periférica de ratón.**

**\* Muestras que presentan DES con el testigo negativo ( $p < 0.001$ )**



**Fig 10 Efecto citotóxico de extractos proteicos de *Phaseolus acutifolius* var. *Latifolius* en sangre periférica de ratón.**

**\* Muestras que presentan DES con el testigo negativo ( $p < 0.001$ )**

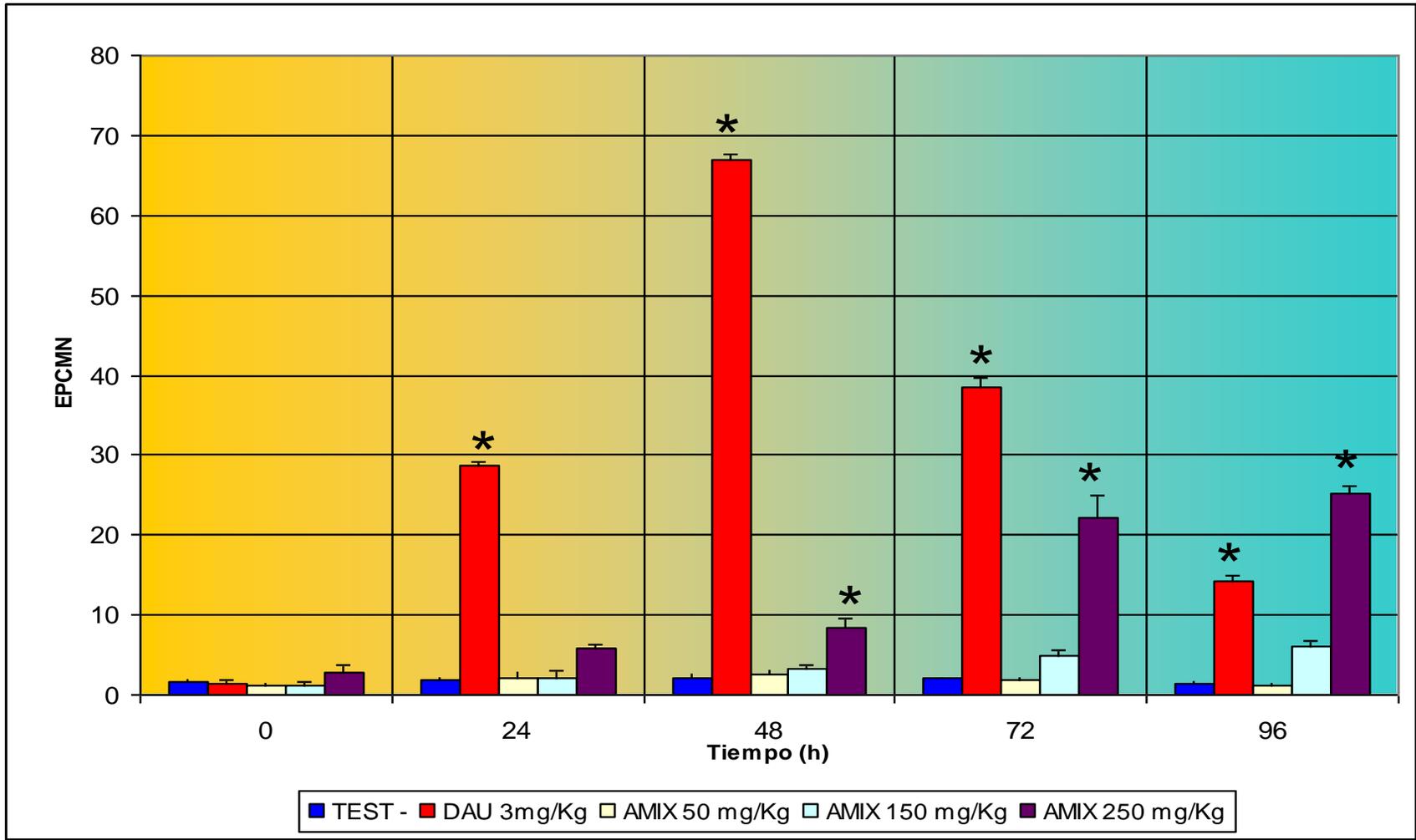


Fig 11 Efecto genotóxico de extractos proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* en sangre periférica de ratón.

\* Muestras que presentan DES con el testigo negativo ( $p < 0.001$ )

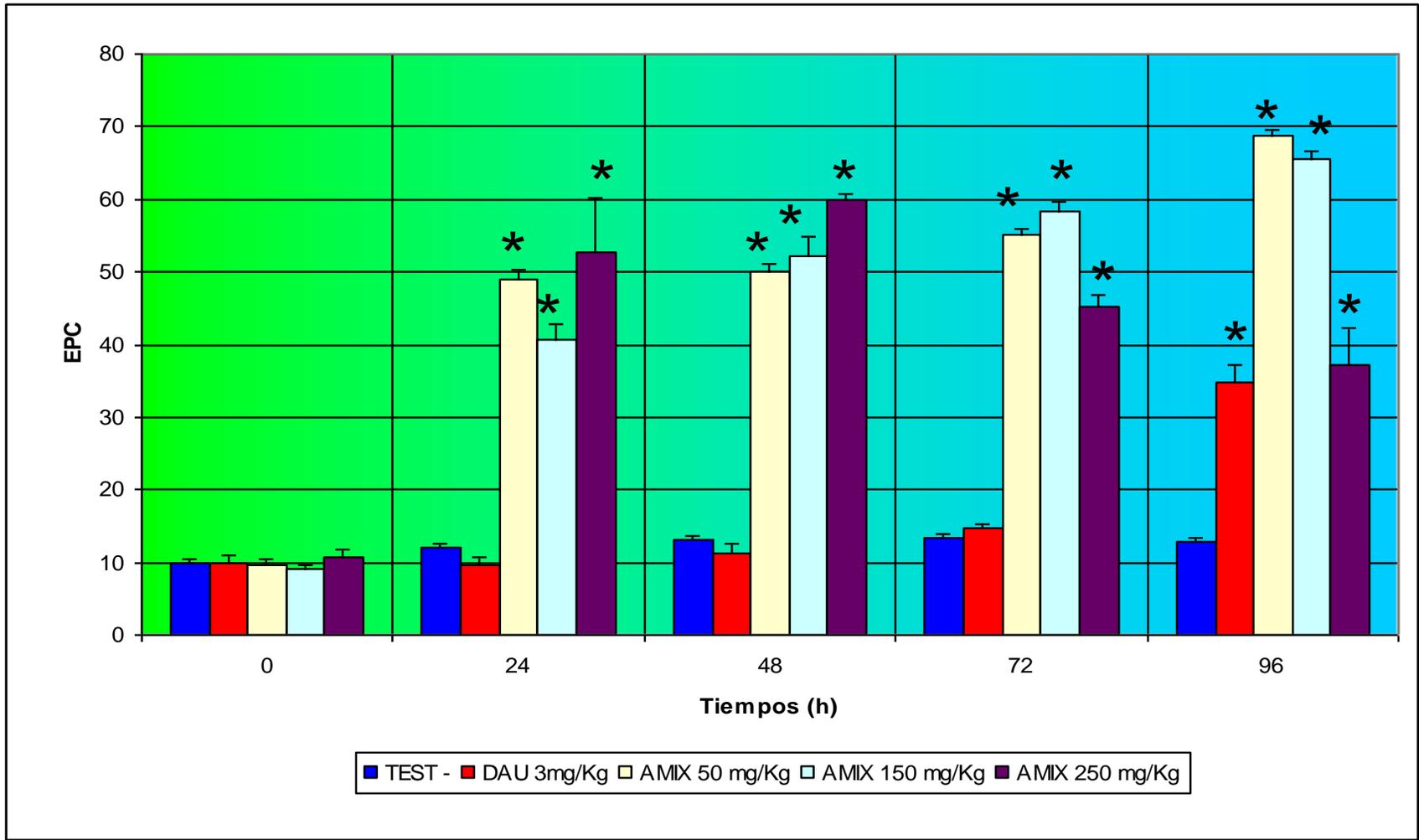


Fig 12 Efecto citotóxico de extractos proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* en sangre periférica de ratón.

\* Muestras que presentan DES con el testigo  $p < 0.001$

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Para extraer compuestos de carácter proteico y conservar sus características bioactivas, es mejor utilizar soluciones salinas amortiguadas.
- ❖ Los extractos proteicos de frijol tépari blanco (*Phaseolus acutifolius* var. Latifolius) administrados vía intraperitoneal no son tóxicos, mientras que para en el caso del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) se observó una toxicidad moderada en machos CD1<sup>+</sup>, ambos en un ensayo agudo de acuerdo al método de Lorke.
- ❖ El frijol tépari blanco actúa como estimulador de la eritropoyesis presentado riesgo genotóxico a las 48 h de su administración con su posterior disminución, según lo demuestran las dosis administradas en un ensayo agudo.
- ❖ El extracto proteico de amaranto de Mixquiahuala (AMIX II) resultó ser genotóxico a una concentración de 250 mg/Kg a partir de las 48 h hasta las 96 h de muestreo.
- ❖ Se observó que al administrar los extractos proteicos de amaranto estimularon el proceso de eritropoyesis a partir de las 24 h manteniéndose este efecto hasta las 96 h a concentraciones de 50 y 150 mg/Kg, demostrando una mayor bioactividad en comparación con los extractos proteicos del frijol tépari blanco.

## IX. PERSPECTIVAS

- ❖ Los resultados sugieren la necesidad de confirmar su toxicidad con otros modelos y dosis e identificar y purificar los componentes activos de los extractos, algunos de estos compuestos tóxicos podrían ser, taninos, Inhibidores de Tripsina, Inhibidores de Amilasa, saponinas, lectinas, oxalatos y fitatos, para evaluar un posible daño genotóxico y citotóxico.
- ❖ Una prueba que podría confirmar el efecto genotóxico es la de ensayo cometa y para comprobar el daño tisular un examen histopatológico de órganos como hígado, corazón, pulmón, riñón, bazo y cerebro, además de realizar de un estudio de química sanguínea.
- ❖ Como ya fue mencionado, en México el amaranto crudo es consumido en productos naturistas, por ello es necesario realizar pruebas toxicológicas a este tipo de productos.
- ❖ Otra forma de consumo del mismo, es con tratamiento térmico, el reventado, previo a la elaboración de alimentos destinados al consumo humano, por lo que sería necesario realizar pruebas que descarten riesgos toxicológicos.
- ❖ Con respecto al frijol no es recomendable consumirlo sin ningún tipo de tratamiento previo, como lo puede ser el remojo, la cocción, horneado, entre otros.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Adler, I. D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, S. Venitt and J. M. Parry (Ed.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., 275-306.
- ❖ Alcalá, P. (1978). Tachinidos parásitos de *Copitarsia turbata* Herr-Shaff en el valle del Mantaro. Rev. Peruana de Entomología Agrícola. **21**:126-129.
- ❖ Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., Martino-Roaro, L., Espinosa-Aguirre, J. J. (2004). Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. *Toxicol lett*, **25**: 152:203-11.
- ❖ Amaranthum: Asociación Mexicana del Amaranto A. C. (AMA, 2006). [www.amaranta.com.mx](http://www.amaranta.com.mx)
- ❖ Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity. *Test, Mutat. Res.*, **31**: 347-364.
- ❖ Antunes, P.L. y Sgarbieri, V.C. (1980). Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* **28**: 935-39.
- ❖ Azevedo, L., Gomes, J. C., Stringheta, P. C., Gontijo, A. M, Padovani C. R., Ribeiro L. R., Salvadori, D. M. (2003). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food Chem Toxicol.*, **41**:1671-6.
- ❖ Baltensperger, D. (1991). Release of Plainsman (P.I. 538322) grain amaranth. *Legacy* **4**: 7-12.
- ❖ Basu, N. and Rastogi, R. (1967). Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytochem.*, **6**: 1249-1270.
- ❖ Bernaldo, S.N. (1998) Sustancias Tóxicas en Productos Vegetales. Acribia. Zaragoza.
- ❖ Berti, M., Serri, H., Wilckens, R. y Figueroa, I. (1997). Field evaluation of grain amaranth (*Amaranthus spp.*) in Chile. En: J. Janick (ed.). Progress in New Crops. ASHS Press, VA. Alexandria. 223-226.

- ❖ Birk, Y. and Peri, I. (1980). Saponins. In: Toxic constituents of foodstuffs. Liener, I. (Ed.) Academia Press, N.Y. Inc. 2th edition: 161-182,
- ❖ Boyd W. C., Slapeigh E. (1954).Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. *Immunology*; **73**:226-234.
- ❖ Brenner, D. (1990). Seed shattering control with indehiscent utricles in grain amaranths. *Legacy*, **3**: 2-3
- ❖ Brenner, D. (1992). The Plainsman story. *Legacy*. **1**: 12-13.
- ❖ Bressani, R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Foods Reviews International*. **51**: 1338-40.
- ❖ Brümmer, J.M. y G. Morgenstern. (1992). Backeig enschaften der Pseudo-Cerealien Amarant and Quinoa. *Getreide, Bot.* **46**: 78-84.
- ❖ Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte ADN-Repair Assay, *Mutat. Res.*, **189**: 123-133.
- ❖ Cárdenas, L. L. (1991). Caracterización y efecto de la densidad en el cultivo de amaranto (*Amaranthus cruentus L.*), manejado mediante el sistema orgánico. Tesis Ing. Agrónomo. Univ. de Chile, Santiago, Chile.
- ❖ Carrasco, F. (1987). Insectos de la kiwicha (*Amaranthus caudatus L.*) cultivada en Cusco y Apurímac. *Rev. Peruana de Entomología Agrícola*. **30**: 38-41.
- ❖ Casillas, G.F. (1986) a. Importancia de la semilla de alegría. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto, Chapingo, México. 289-299.
- ❖ Casillas, G.F. (1986) b. Obtención de nuevos productos a partir de la semilla de la alegría. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto, Chapingo, México. 300-306.
- ❖ Cervantes, M. J. (1986). El amaranto como alimento para animales. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto, Chapingo, México. 354-360.
- ❖ Cervellini, J.E., R.O. Braun, R. Estéves y F. Covas. (1994). Efecto de la sustitución parcial del maíz (*Zea mays L.*) por grano de amaranto (*A. mantegazzianus Passer*) suministrado en dos modalidades integrando la

- dieta de terminación de pollos parrilleros. El amaranto y su potencial **2**: 24-25.
- ❖ Chaturvedi, A. G., Sarojini y N.L. Devi. (1993). Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*A. esculentus*). *Plant. Food for Hum. Nutr.* **44**: 63-70.
  - ❖ Clark, K.M. y R.L Myers. (1994). Intercrop performance of pearl millet, amaranth, cowpea, soybean and guar in response to planting pattern and nitrogen fertilization. *Agro. J.* **86**: 1097-1102.
  - ❖ Collazos, C. et al., (1975). La composición de los alimentos peruanos: Ministerio de Salud, 5ta. Edición. Lima.
  - ❖ Collins, J.L. y Beaty, D.F. (1980). Heat inactivation of trypsin inhibitor in fresh green soybeans physiological responses of fed rats the beans. *J. Food Sci.* **45**: 542-50.
  - ❖ Committe on Food Protection. (1976). Toxicants occurring naturally in foods. National Academy of Sciences, Washington, D.C
  - ❖ Connor, J.K., R.J.W. Gartner, M.R. B.M. Runge y R.N. Amos. (1980). *Amaranthus edulis*: an ancient food source re-examined. *Aust. J. Exp. Anim. Husb.* **20**: 156-161.
  - ❖ Cosgrove, D.J. (1980). The determination of myo-inositol hexaphosphate (phytate). *J. Sci. Food Agric.* **31**:1253-4.
  - ❖ Countryman P. I., Heddle J. A. (1976). The Production from Chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, **41**: 321-332.
  - ❖ Crowley, J.F., Golstein I.F. (1982). *Datura Stramonium* lectin. *Methods Enzymol.* **83**: 368-373.
  - ❖ Cruz, A. M. (2001). Efecto de la localidad de siembra, reventado y germinado sobre las características físicas, químicas, nutricionales y antinutricionales en la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis de Ingeniería, UASLP, 41-66.
  - ❖ Domingo, V. M. V. (1986). Utilización de la harina de amaranto en la elaboración de pan tipo caja. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México, 406-419.

- ❖ Early, K.D. (1986). Cultivo y usos del *Amaranthus* (kiwicha) en dos centros de domesticación: México y Perú. En: V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos. Puno, 0- 14 marzo. PISA, IID-CANADA. Puno, Perú.
- ❖ Elbehri, A., D.H. Putman y M. Schmitt. (1993). Nitrogen fertilizer and effects on yield and nitrogen efficiency of grain amaranth. *Agric J.* **85**: 120-128.
- ❖ Espitia, R.E. (1986) a. Plagas y enfermedades del amaranto (*Amaranthus spp.*) en México. En: Primer Seminario Nacional del amaranto. Chapingo, México, 233-238.
- ❖ Espitia, R.E. (1986) b. Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de *Amaranthus spp.* Tesis Profesional. UAAN. Saltillo, Coahuila, México.
- ❖ Espitia, R.E. (1991) a. Revancha: variedad mejorada de amaranto para los valles altos de México. 64. En: Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos.
- ❖ Espitia, R.E. (1991) b. Estabilidad del rendimiento en amaranto. En: Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos, México, 22-27. 65-67.
- ❖ Espitia, R. E., Gonzales C. F. y Miranda, C. S. (1991). Asociación genética del rendimiento y sus componentes en razas de amaranto. En: Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos, 22-27 México. 39
- ❖ FAO. (1990). Guía para el manejo de plagas en cultivos andinos subexplotados. Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- ❖ FAO. (1992). Manual sobre utilización de cultivos andinos subexplotados en la alimentación. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- ❖ FAO/OMS/ONU. (1985). Necesidades de energía y proteínas. OMS., Ginebra. Serie de Informes técnicos N° 724.
- ❖ Fenech, M. (2000). The Micronuclei Technique. *Mutat Res.* **455**, 81-95.

- ❖ Fenech, M. (2007). The Micronuclei Technique. En primer congreso internacional "Tópicos selectos en toxicología genética". Pachuca de Soto, Hidalgo.
- ❖ Fenwick, D. and Oakenfull, D. (1981). Saponin content of soya beans and same commercial soya bean products. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 273- 278.
- ❖ Ferguson, L.R. (1999). Natural and Man-Made Mutagens and Carcinogens in the Human Diet, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **443**; 1-10.
- ❖ Figueroa, M., Manzini, J., Lajolo, F. (1984). Aco antinutricional dasfitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, *L. Arch. Latinoam. Nutr.* **24**: 488-499.
- ❖ Frantzen, T. (1993). Amaranth in rotations. *Legacy* **6**: 4-5.30
- ❖ García, L.A., Alfaro M.A. y Bressani. R. (1987). Digestibility and nutritional value of crude-oil from three amaranth species. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **64**: 371-375.
- ❖ Garmendia, A. (1985). Enfermedades del amaranto. Programa de Investigación del Amaranto. Informe 83-2. Cusco, Perú.
- ❖ Gatehouse, A. M. R. Antinutritional proteins in plants. Develepment in food protein 3. Hudson, B. J. (Ed). Applied Sciences publisher. LTD. London and New York.
- ❖ Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutat Res.*, **312**: 217-233.
- ❖ Gómez, O.S. y F.J. Tena. (1986). Cambios en la concentración de lisina y proteína durante la germinación del amaranto. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México, 502- 512.
- ❖ Gonzáles De Mejía E., Grajeda P., Celada E., Valecia M.E., (1988). Characterization of the nutritional potential of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) grown in Mexico. *Arch. Nutr.* **38**: 9007-924.
- ❖ Goldstein, I.J. (1980). What should be called lectin Nature; **285**: 66-8.

- ❖ Gooderham, N.J., Murray, S., Lynch, A.M., Edwards, R.J., Yadollahifarsani, M., Bratt, C., Rich, K.J., Zhao, K., Murray, B.P., Bhadresa, S., Crosbie, S.J., Boobis, A.R., and Davies, D.S., (1996). Heterocyclic Amines - Evaluation of Their Role in Diet Associated Human Cancer, *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **42**: 91-98
- ❖ Griffins, D.W. y Thomas, T.A. (1981). Phytate and total phosphorus content of field beans (*Vicia faba* L.). *J. Sci. Food Agric.* **32**:187-190.
- ❖ Gudiseva-Chandrasekher, D.; Suryaprasad-Raju y Thillaisthanam, N.; Pattabiraman. (1981). Natural plant enzyme inhibitors an amylase inhibitors in millets. *J. Sci. Food Agric.* **32**:9-15.
- ❖ Hartmut, F. (1988). Advances in lectin research. Vol 1, Berlín: Spring-Verlag. 123-145.
- ❖ Hauptli, H. (1977). Agronomic potential and breeding amaranth. Proc. First Amaranth Semin. Emmaus, Pa. 14-19.
- ❖ Hauptli, H. y K. Jain. (1980). Genetic polymorphisms and yield components in a population of amaranth. *J. Hered.* **71**: 290-292.
- ❖ Henderson, T.L. (1993). Agronomic evaluation of grain amaranth in North Dakota. Tesis Ph. D. North Dakota State, North Dakota, USA.
- ❖ Hegsted, M. and Linkswiller, H. (1980). Protein quality of high and low saponin alfalfa protein concentrate. *J. Sci. Food Agric.* **31**: 777-781.
- ❖ Hevia, H., Berti, D., Wilckens, E. (2002). Contenido de proteínas y algunas características de almidones en semillas de amaranto (*Amaranthus spp.*) cultivado en Chillan, Chile. *Agro sur.* **30**: 24-31.
- ❖ Huissman, J. (1992). Aspects of antinutritional factors (ATFs) in relation to nutrition and pollution. In 19<sup>th</sup> World Poultry Congress. Amsterdam.
- ❖ Humphries, C. (1980). Trypsin inhibitor in leaf protein concentrates. *J. Sci. Food Agric.* **31**:1225.
- ❖ Irving, D.W., Betschart, A.A. y Saunders, R.M. (1981). Morphologic studies on *Amaranthus cruentus*. *J. Food Sci* **46**: 1170-1173.
- ❖ Jaffe, W.G. (1980). Hemmagglutinin. In: Toxic constituyenst of plants foodstuff. Ed by IE. Liner. New York, U.S.A., Academic Press. 73-102.

- ❖ Jaik, A.D. y F.J. Tena. (1986). Optimización del proceso de tostado de la semilla de alegría (*Amaranthus hypochondriacus*) y diseño de un prototipo de tostadora. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México, 397-405.
- ❖ Jimenez, P.R. y E.S. Cordero. (1986). *Amaranthus spp.* en la alimentación xochimilca y su proyección en la alimentación básica. En: Primer Seminario Nacional del amaranto Chapingo, México. 56-64.
- ❖ Kakade, M., Rackis, J., McGhee, J. and Puski. G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A colaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* **51**: 376-382
- ❖ Kauffman, C.S. (1986). Observaciones sobre las investigaciones preliminares para el desarrollo de variedades mejoradas de amaranto de grano en cinco países. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 280-285.
- ❖ Kauffman, C.S. y. Weber, L. E. (1990). Grain amaranth. En: J. Janick and J.E. Simon (Ed.). *Advances in New Crops*. Timber Press. Portland, OR. 127-139.
- ❖ Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. 52-77.
- ❖ Koeppe, S. J.; Rupnow, J. H.; Walter, C. E. y Davis, A. (1985). Isolation and heat stability of inhibitors in amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*). *J. Food Sci.* **50**: 1519-20.
- ❖ Koeppe, S.J. y Rupnow, J.H. (1988). Purification and characterization of a lectin from the seeds of Amaranth (*Amaranthus cruentus*). *J. Food Sci.* **53**:1412-1417.

- ❖ Kozuharov, S.; Oakenfull, D.G.; Sidhu, G.S. (1986). Navy beans and navy bean saponins lower plasma cholesterol concentrations in rats. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia* **11**:162-67.
- ❖ Kulakow, P.A., H. Hauptli y S.K. Jain. (1985). Genetics of grain amaranths. I. Mendelian analysis of six color characteristics. *J. Hered.* **76**: 27-30.
- ❖ Kulakow, P.A. y S.K. Jain. (1985). The inheritance of flowering in *Amaranthus* species. *J. Genet.* **64**: 85-100.
- ❖ Kulakow, P.A. y S.K. Jain. (1987). Genetics of grain amaranths. IV. Variation in early generation response to selection in *Amaranthus cruentus* L. *Theor. Appl. Gen.* **74**:113-120.
- ❖ Lázaro, E. y J. Sarmiento. (1988). Estudio de la abundancia relativa de las plagas de los cultivos de quinua y kiwicha en la Molina. En: VI Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos. INIAP, CIID-CANADA. Quito, Ecuador. 75-180.
- ❖ Lehman, J.W. (1990). Pigments of grain and feral amaranths. *Legacy* 3: 3-4.
- ❖ Lehman, J. W., R.L. Clark y K.J. Frey. (1991). Biomass heterosis and combining ability in interspecific and intraspecific rating of grain amaranths. *Crop Sci.* **31**: 1111-1116.
- ❖ Lehmann, J. W. (1991). The industrialization and commercialization of Amaranth an alternate approach. In: Primer Congreso Internacional del Amaranto. Septiembre 22-27. Oaxtepec, Morelos. México.
- ❖ Lee, K. y Abendroth, J.A. (1983). High performance liquid chromatographic determination of phytic acid. *J. Food Sci.* **48**:1344-50
- ❖ Liener, I.E. (1976). Legume Toxins. *J. Food Sci.* **41**:1076 -79.
- ❖ Liu, K. and Markakis, P. (1989). An improved colorimetric method for determining antitryptic activity en soybean products. *Cereal Chem.* **66**: 415-422.
- ❖ Lorke, D. (1983). New approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**: 275-287.
- ❖ Lowry, O. H., Rosenbrough, J. N., Fan, A., Randall, J. R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **193**: 265-275.

- ❖ Lutz, R. (1986). Observaciones sobre el cultivo y usos del amaranto en América Latina. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 225-231.
- ❖ Lyon, C.K. y R. Becker. (1987). Extraction and refining of oil from amaranth seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**: 233-45.
- ❖ Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutat. Res.*, **312**: 263-285.
- ❖ Madrigal, S. E. (2007). En primer congreso internacional "Tópicos selectos en toxicología genética". Pachuca de Soto, Hidalgo.
- ❖ Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutat. Res.*, **113**: 173-215.
- ❖ Masoni, A. y L. Ercoli. (1994). Influencia de la época de cosecha sobre el rendimiento de concentrado de proteína foliar de amaranto. el amaranto y su potencial **2**: 17-23.
- ❖ McVan, B.F. (1995). Índice de medicamentos. ED. Acribia México.
- ❖ Mitjavile, S. (1990). Sustancias naturales nocivas en los alimentos. En Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Derache, R. (Coordinador). Ediciones Omega, S.A., Madrid. 109-132.
- ❖ Monteros, J.C., C. Nieto, C. Caicedo, M. Rivera, y C. Vimos. (1994). INIAP-Alegria, Primera variedad mejorada de amaranto para la sierra Ecuatoriana. INIAP. Boletín Divulgativo; 245. Ecuador.
- ❖ Mujica, S.A. (1992). Granos y leguminosas andinas. P. 129-146. En: Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. J.E. Hernandez B. y J. Leon (ed). Colección FAO. Producción y Protección Vegetal N°26. Italia, Roma.
- ❖ Mujica, S. A. (1994). Resistencia duradera en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). En: Taller sobre resistencia duradera en cultivos alto andinos. 30 may - 2 junio. Quito. INIAP-WAU-DGIS. Ecuador, 23-24.
- ❖ Mujica, S.A. y A. Quillahuaman. (1989). Fenología del cultivo de la kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). En: Curso taller fenología de cultivos andinos y

uso de la información agrometeorológica. Puno, 7-10 agosto. INIA, PICA. Perú. 29-31.

- ❖ National Research Council, (1984). Amaranth: modern prospects for ancient crop. National Academy Press, Washington, D.C.
- ❖ Necochea, M.H., C.J. Camacho y G.R. Perez. (1986). Elaboración de una pasta a base de Alegria (*Amaranthus leucocarpus* S.Wats.). 459-478. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México.
- ❖ Nieto, C. (1990). El cultivo de amaranto (*Amaranthus spp*) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE. Santa Catalina. Quito, Ecuador.
- ❖ Oakenfull, D. (1981). Saponins in food: a review. *Food Chem.* **6**: 19-40.
- ❖ Ortega, G.L. (1990). Usos y valor nutritivo de los cultivos andinos. INIA, PICA. Arequipa, Perú.
- ❖ Oberleas, D. (1973). Phytates. In: Toxicants occurring naturally in food. Committee on Food Protection (Ed.) National Academy of Sciences, Washington, D.C. 363-371,.
- ❖ Padhye, V.W. y Salunkhe, D.K. (1981). Studies in black grain (*Phaseolus mungo* L.) trypsin inhibitor. *J. Food Biochem.* **4**:119-120.
- ❖ Peres, J.L., A. Sanchez, J. Kuri y L. Zavala. (1986). Producto instantáneo para elaboración de cremas alimenticias. 321-328. En: Primer Seminario Nacional Del Amaranto. Chapingo, México.
- ❖ Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *in Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, **189**: 157-165.
- ❖ Puntieri, M. V., Apro, N. J. (2004). Industrialización, valor nutritivo y usos de la harina integral del amaranto. 5ª jornada de desarrollo y motivación. INTI.
- ❖ Pusztai, A., Grant, G., Sakhri, M. and Bardocz, S. (1995). Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. *J. Agri. Food Chem.* **43**: 165-170.
- ❖ Pusztai, A., Grant, G., Duguid, T., Brown, D.S., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. and Bardocz, S. (1995) Inhibition of starch digestion by -

amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. *J. of Nutr.* **125**: 1554-1562.

- ❖ Ramírez, J.S.; Mitchel, H.L. (1960). The trypsin inhibitors of alfalfa. *J. Agric. Food Chem.* **8**: 393-395.
- ❖ Rackis, A. (1974). Biological and physiological factors in soybeans. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **51**:16A.
- ❖ Rastrelli, L., Pizza, C., Saturnino, P. Schettino, O., Dini, A. (1995). Studies on the Constituents of *Amaranthus caudatus* (Kiwicha) Seeds. Isolation and Characterization of Seven New Triterpene Saponins. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 904-909.
- ❖ Rayas-Duarte, P. y R. Joeb. (1992). Study on the squalene content in amaranth grains (Abstracts). Proceedings of the 6th Annual National Meeting of the Amaranth Institute, North Dakota State. University, Fargo, N.D.
- ❖ Rayas-Duarte, P., C.M. Mock y L.D. Satterlee. (1996). Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth and lupin flours. *Cereal Chem.* **73**: 381-387.
- ❖ Reyes-Moreno, C. y Paredes-López, O. (1993) Hard-to-cook phenomenon in common beans- A review. Critical Review- *Food Sci Nutr.* **33**: 227-286.
- ❖ Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney. 115-141.
- ❖ Robertson, K.R. (1981). The General of Amarantaceae in the south eastern United States. *J. Arnold Arboretum.* **62**: 267-314.
- ❖ Rodale, R. (1977). Fixing Amaranth: Nutritional Charts and Recipes. p. 37-48. In: Amaranth Round-Up. Pennsylvania, USA.
- ❖ Rodríguez, M. V., Riquelme, B., Valverde, J., Gattuso, S. (2004). Caracterización del efecto hemaglutinante de lectinas de la familia de las

Fabaceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imagen. *Anales Afa.* **16**: 247-248.

- ❖ Roy, D.N. (1980). Trypsin inhibitor from *Lathyrus sativus* seeds. *J. Agric Food Chem.* **28**: 48-56.
- ❖ Ruiz, R., Price, K., Fenwick, G. Arthur, A. and Petterson, D. (1993). The saponin content and composition of sweet lupin seed. In: Recent advances in research in antinutritional factors in legume seeds. Van der Poel, A., Huisman, J. and Saini, H. (Eds.) Wageningen Pers. EAAP publication # 70, , Wageninen. 147-150
- ❖ Saini, H. S. (1989). Thermal stability of protease inhibitors in some cereal and legumes. *Food Chem.* **25**: 59-68.
- ❖ Salgado-Telpalo, J.D. (2006). Purificación y caracterización bioquímica y fisicoquímica de lectinas del frijol y amaranto cultivados en el estado de hidalgo, Tesis de Licenciatura, UAEH. 66-70.
- ❖ Sánchez, M.A. (1980). Potencial agroindustrial del amaranto. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México.
- ❖ Sánchez, M.A. y S. Maya. (1986). Enriquecimiento del maíz con harina de amaranto en la elaboración de tortilla. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 421-435.
- ❖ Sánchez, M.A., M.V. Domingo, J.A. Torres y S. Maya. (1986). Fortificación de semolina con harina integral de amaranto. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 479-494.
- ❖ Sánchez, M.A., J. Peres, J. Briones y J. Kuri. 1986. Potencialidad de la hoja de amaranto. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 307-314.
- ❖ Sánchez, E.M., R.E. Espitia y K.S. Osada. (1991). Etiología del Tizón (*Alternaria tenuis*) en Amaranto (*Amaranthus ssp.*). En: Primer Congreso Internacional del Amaranto. Septiembre 22-27. Oaxtepec, Morelos, México. 66.
- ❖ Sánchez, E.M., R.E. Espitia y K.S. Osada. (1991). Etiologia de la mancha negra del tallo (*Macrophoma sp.*) en el Amaranto (*Amaranthus sp.*). En:

Primer Congreso Internacional del Amaranto. Septiembre 22-27. Oaxtepec, Morelos, México. 67-79.

- ❖ Santa Cruz, U.H. y M.N. Marban. (1986). Respuesta del cultivo de alegría *Amaranthus hypochondriacus* a niveles iniciales de infestación del nematode *Nacobbus aberrans*. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 193-203.
- ❖ Sauer, J.D. (1950). The grain amaranthus. A survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical garden*. **37**: 561-632.
- ❖ Sauer, J.D. (1976). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of Missouri Botanical Garden* **54**: 103-137.
- ❖ Saunders, R.M. y R. Becker. (1984). Amaranthus: A potential food and feed resource. En: Adv. Sci. Tech. Vol.VI. AACC. Ed. Pomeranz.
- ❖ Schmit, W. 1975. The Micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**: 9-15.
- ❖ Sepúlveda, H. (1989). Quinoa y amaranto: dos pseudocereales con gran perspectiva. *El Campesino* 120 : 970-80
- ❖ Sgarberi, S. K., Galezzi, M.A.M. (1990). Quantifications and chemical and biochemical charatetization of nitrogenous substances from varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*. L.). *J.Food Biochem*. **14**:233-43.
- ❖ Sharon N, Lis H. (1972). Lectins cell aglutinating and sugar-specific proteins. *Sci.*; **177**:949-58.
- ❖ Singhal, R.S. y P.R. Kulkarni. (1988). Review: amaranth and under utilized resource. *Int. J. Food Sci. Tech*. **23**: 125-139.
- ❖ Sugimura, T., History: present and future of HAs en Cooked food mutagens (1995). Eds. R.H. Adamson; J.A. Gustafsson; N. Ito; M. Nagao; T. Sugimura; K. Wakabayashi; Y. Yamazoe. Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation. Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey, 214-231.
- ❖ Sosa, C.T. (1986). Valor nutritivo de rastrojos de achita (*Amaranthus caudatus* L.), soya (*Glicine max*) y alfalfa (*Medicago sativa*) en Ayacucho a

2695 msnm. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga. Ayacucho, Perú.

- ❖ Savelkoul, F., Van der Pool, A. and Tamminga, S. (1992). The presence and inactivation of trypsin-inhibitors, tannins, lectins, and amylase-inhibitors in legume seeds during germination. *Areview. Plant Foods Hum. Nutr.* **42**: 71-85.
- ❖ Sotelo, A., Soto, M., Lucas, B. and Giral, F. (1993). Comparative studies of the alkaloidal composition of two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of the destoxified seeds. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 2340-2343.
- ❖ Subramanian, N. y M. Rodríguez. (1986). Alternativa tecnológica para el amaranto. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 376-379.
- ❖ Sumar, K.L. (1986). Avances del programa de investigación de *Amaranthus* del CICA, Cusco, Perú. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. 141-151.
- ❖ Sumar, K.L. (1993). La kiwicha y su cultivo. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco, Perú.
- ❖ Taggart, R., Storey, R., Bower, N. (1983). Nutritional Evaluation of Tepary Bean: Elementary Analysis of Seed. *J. Plant Nutr.* **6**: 983-987.
- ❖ Tapia, M. (1997). Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. 2a Edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- ❖ Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutat. Res.*, **312**: 305-312.
- ❖ Torres B., O, Zamora P., A.L., Esparza F., A, López G., B, Feria V., A, Cantú, J.M. y Zúñiga, G. (1999). Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, **56**: 212-217.

- ❖ Transue, D.K., D.J. Fairbanks, L.R. Robinson y W.R. Andersen. (1994). Plant genetic resources. *Crop Sci.* **34**: 1385-389.
- ❖ Valadez-Vega, Gonzalez, D. E., Reynoso-Camacho, R., Loarca-Pina (2005). Tanins, Trypsin Inhibitors and Lectins Cytotoxicity in Tépari (*Phaseolus acutifolius*) and Common bean (*Phaseolus vulgaris*) Beans. *Plant .food Hum. Nutr.* **60**: 137-145.
- ❖ Valadez-Vega, M. C. (1993). Adaptación agronómica, calidad química, física, toxicológica y aceptabilidad de líneas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) en estado de Querétaro. Tesis de Maestría en Ciencias, UAQ. 14-15.
- ❖ Valdivié, M., H.A. Alfonso y L.M. Fraga. (1989). Amaranthus: Un cereal antiguo con posibilidades en la avicultura moderna. *Avicultura Profesional* 6: 140-144.
- ❖ Van der Poel, T., Van Zuilichem, D. and Van Oort, M. (1990). Thermal inactivation of lectins and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and effects on protein quality. *J.Sci. food Agric.* **53**: 215-229.
- ❖ Vergara, C. y G. Sanchez. (1983). Pyralidae registrados en el Museo de Entomología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Ministerio de Agricultura. Segunda Edición. Lima, Perú.
- ❖ Veríssimo, L. A. (1999). Leguminosas grano. En: Enciclopedia práctica de la agricultura y ganadería. ED. Océano 353-354.
- ❖ Vilca, J. y A. Jeri. (1989). Evaluación preliminar de los daños de un Curculionido (Coleoptera) barrenador de tallo, sobre el banco de germoplasma de Achita (*Amaranthus caudatus* L.) en Ayacucho. En: Convención Nacional de Entomología, 32°. Soc. Ent. del Perú. Lima, Perú. 27.
- ❖ Wakabayashi, K. and Sugimura, T. (1998). Heterocyclic Amines Formed in the Diet - Carcinogenicity and Its Modulation by Dietary Factors, *J.Nutr.Biochem.* **9**: 604-612.

- ❖ Waldroup, P.W. y H.M. Hellwing. (1985). The utilization of grain amaranth by broiler chickens. *Poultry Sci.* **64**: 759-762.
- ❖ Walters, R.D., D.L. Coffey y C.E. Sams. (1988). Fiber, nitrate and protein content of *Amaranthus* accessions as affected by soil nitrogen application and harvest date. *Hort Sci.* **23** (2): 338-341.
- ❖ Weder, J. K. (1981). Protease inhibitors in the *Leguminosae*. In: Advances in legume systematics. Polhill, R. and Raven, P. (Eds.) Royal Botanic Garden Kew. 533-560 England.
- ❖ Weisburger, J.H., Rivenson, A., Kingston, D.G.I., Wilkins, T.D., Van Tassell, R.L., Nagao, M., Sugimura, T., y Hara, Y., Dietary modulation of the carcinogenicity of HAs in Cooked food mutagens. (1995). Eds. R.H. Adamson; J.A. Gustafsson; N. Ito; M. Nagao; T. Sugimura; K. Wakabayashi; Y. Yamazoe. Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation. Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey, 240-250.
- ❖ Whitaker, J.R. and Feeney R. E. (1973). Enzyme inhibitors in food. In: Toxicants occurring naturally in food. Committee on Food Protection (Ed.) National Academy of Sciences, 276-298, Washington, D.C.
- ❖ Wilson, R.L. 1996. Another amaranth pest: blister beetles. *Legacy.* **9**: 9-10.
- ❖ Yabar, E. y B. Baca. (1981). Algunos lepidópteros que atacan al tarhui (*Lupinus mutabilis* Sweet.) en el Cusco. *Revista Peruana de Entomología Agrícola* 24: 81-85.
- ❖ Zacalain, M., Sierrasesúмага, L., Patiño, A. (2005). El ensayo de micronucleos con medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.*; **28**; 227-236.
- ❖ Zúñiga G., G., Gómez M., B.C., Zamora P., A, Ramos I., M.L., Batista G., C.M., González R., A., Luna A., J. y Rodríguez Á., J.L. (2002). alternativa para estudios de genotoxicidad. *Nowet*, 1, 5-9.