



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO
POR LC-MS/MS ORBITRAP Y EL POTENCIAL
ANTIDIABÉTICO Y ANTIHIPERTENSIVO DEL
AMARANTO ROJO (*Amaranthus cruentus* L.)**

Tesis que presenta

JESÚS ALFREDO ARAUJO LEÓN

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Biología Integrativa)**

Mérida, Yucatán, México

2025

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Jesús Alfredo Araujo León titulado **Determinación del Perfil Metabólico por LC-MS/MS Orbitrap y el potencial Antidiabético y Antihipertensivo del Amaranto Rojo (*Amaranthus cruentus* L.)**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación de Metabolismo Integrativo, en el laboratorio No. 22 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández y la Dra. Ivonne Sánchez del Pino, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



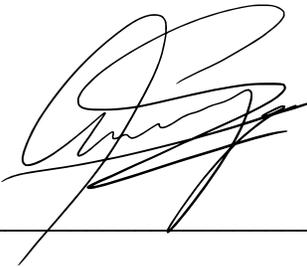
Dr. José Luis Hernández-Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 02 de junio de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Jesús Alfredo Araujo León

Este trabajo se llevó a cabo en la **Unidad de Biología Integrativa** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “**Estudio interdisciplinario en las poblaciones nativas mexicanas de Amarantho para determinar su centro de domesticación y valorar los rasgos agrícolas que permitan la mejora de cultivares**” (FORDECYT-PRONACES-15319/2020) bajo la dirección del **Dr. Victor Aguilar Hernández** y la **Dra. Ivonne Sánchez del Pino**.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por la beca otorgada para los estudios de doctorado (Beca 800585).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., y a la Unidad de Biología Integrativa del CICY, por las instalaciones y la infraestructura otorgada para el desarrollo de mi tesis de doctorado.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán, por las instalaciones y permitirme utilizar el equipo UHPLC-UV-DAD.

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, por el uso del bioterio a cargo del Dr. Rolffy Ortiz Andrade.

A mis asesores, Dr. Victor Aguilar Hernández y Dra. Ivonne Sánchez del Pino, con quienes me siento profundamente agradecido por recibirme como estudiante para realizar mis estudios de doctorado y siempre darme la confianza y facilidades para desarrollar libremente mis ideas científicas.

A la M. en C. Ligia Guadalupe Brito Argáez, técnica académica del laboratorio 22, por apoyarme en el desarrollo experimental de mi tesis, el manejo del laboratorio y sus valiosos consejos durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por brindarme siempre consejos académicos, apoyarme en la retroalimentación de artículos y la presente tesis, además de sus valiosas aportaciones en mi proyecto de doctorado como comité evaluador.

Al Dr. Rolffy Ortiz Andrade, por ser un amigo desde hace muchos años y brindarme su apoyo incondicional en el manejo de roedores experimentales, uso del bioterio, y estar siempre dispuesto a escuchar ideas nuevas y poder desarrollarlas.

Al Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa, por sus amables consejos y apoyo en los estudios *in silico* de las enzimas farmacológicas.

A la Dra. Areli Carrera-Lanestosa, por su tiempo, apoyo y consejos en los estudios *in vitro* y apoyarnos con las enzimas farmacológicas.

Al M. en C. Avel González Sánchez y Dr. Germán Giacoman Vallejos, por el espacio en su laboratorio para utilizar el equipo de HPLC-UV-DAD.

Al Dr. Oswaldo Hernández Abreu, por su apoyo en los experimentos *ex vivo* y apoyarnos con el manejo de los animales experimentales.

Al Dr. Andrés Xingú López, por sus consejos, apoyo y ayuda en el manejo del cultivo de amaranto.

A mis amigas y compañeras de doctorado, Evelyn Carrillo Bermejo y Ariana Cleyre Pérez Hernández, les agradezco profundamente su paciencia, sus palabras y su amistad en esta etapa. Finalmente, agradezco profundamente a mis padres, Ing. José Alfredo Araujo Esquinca y Lic. María de Lourdes León Castillejos, por apoyarme siempre en mis estudios académicos, sin duda la mejor herencia que he podido recibir. ¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

La presente tesis la dedicó a mi abuela, la Sra. Ana María Castillejos García, por su infinito amor, sus innumerables consejos y su eterno apoyo.

A todas las mujeres y hombres campesinos del mundo, del ayer y del mañana que, con esfuerzo, dedicación, pasión y amor a la tierra, cuidan y cultivan el amaranto, aquel que fue alimento de los dioses y será el alimento del futuro.

Esta tesis es un pequeño tributo a su esfuerzo incansable y a la importancia de preservar y valorar el germoplasma del amaranto, nuestra herencia prehispánica.

LISTA DE PRODUCTOS ACADÉMICOS GENERADOS

Artículos científicos indizados en el Journal Citation Reports:

1. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., Brito-Argáez, L., Peraza-Sánchez, S. R., Xingú-López, A., & Ortiz-Andrade, R. (2023). **Analysis of Red Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) Betalains by LC-MS.** *Journal of the Mexican Chemical Society*, 67(3), 227–239.
2. Araujo-León, J. A., Sánchez-Del Pino, I., Ortiz-Andrade, R., Hidalgo-Figueroa, S., Carrera-Lanestosa, A., Brito-Argáez, L. G., González-Sánchez, A., Giacomán-Vallejos, G., Hernández-Abreu, O., Peraza-Sánchez, S. R., Xingú-López, A., & Aguilar-Hernández, V. (2024). **HPLC-Based Metabolomic Analysis and Characterization of *Amaranthus cruentus* Leaf and Inflorescence Extracts for Their Antidiabetic and Antihypertensive Potential.** *Molecules*, 29(9), 2003.
3. Araujo-León, J. A., Sánchez-del Pino, I., Brito-Argáez, L. G., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., & Aguilar-Hernández, V. (2024). **In Silico Mass Spectrometric Fragmentation and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Betalainic Fingerprinting: Identification of Betalains in Red Pitaya.** *Molecules*, 29(22), 5485.

Textos de divulgación

1. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., & Brito-Argáez, L. (2022). **Más allá de los colores del amaranto.** *Desde el Herbario CICY*, 14, 117–122.
2. Araujo-León, J. A., Sánchez-del Pino, I., Aguilar-Hernández, V., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., Xingú-López, A., Brito-Argáez, L., & Alcocer-Espejel, N. (2023). **El amaranto o *huauhtli* sagrado del México prehispánico y alimento de alto valor nutricional del México contemporáneo.** *Desde el Herbario CICY*, 15, 123–128.
3. Araujo-León, J. A. (2024). **¿Sabías que el amaranto puede ayudar en la prevención de la diabetes e hipertensión?** En I. Sánchez del Pino, & S. Vergara Yoisura (Eds.), *Xtes: las delicias mayas del amaranto* (1era. Ed., 73–76). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
4. Araujo-León, J. A. (2024). **Huitzilopochtli comía *huautli*: breve historia del amaranto en México.** En I. Sánchez del Pino, & S. Vergara Yoisura (Eds.), *Xtes: las delicias mayas del amaranto* (1era. Ed., 23–25). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Congresos

1. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., & Brito-Argáez, L. **Perfil de betalainas por UHPLC-MS Orbitrap: abordaje en la búsqueda de marcadores quimiotaxonómicos en Caryophyllales.** 17^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. 18 al 20 de mayo de 2022. Monterrey, Nuevo León, México.

-
2. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., Brito-Argáez, L., Peraza-Sánchez, S. R., Xingú-López, A., & Ortiz-Andrade, R. **Red amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) as a promising source of betalains: an approach of metabolomic profile by UHPLC-MS/MS Orbitrap.** XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica. 16 al 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán, México.
 3. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., Ortiz-Andrade, R., Carrera-Lanestosa, A., Brito-Argáez, L., Peraza-Sánchez, S. R., & Xingú-López, A. **Cribado farmacológico del “amaranto rojo” (*Amaranthus cruentus* L.): Búsqueda de un alimento funcional.** 18ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. 24 al 27 de mayo de 2023. Monterrey, Nuevo León, México.
 4. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., & Ortiz-Andrade, R., Hidalgo-Figueroa, S, Carrera-Lanestosa, A., Brito-Argáez, L., González-Sánchez, A., Peraza-Sánchez, S. R., & Xingú-López, A. **In Vitro Pharmacological Screening and Metabolomic Profile of Ten *Amaranthus cruentus* L.: A Survey of Amaranth – A Functional Food.** XX National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress. 16 al 20 de octubre de 2023. Oaxaca, Oaxaca, México.
 5. Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., & Ortiz-Andrade, R., Hidalgo-Figueroa, S, Carrera-Lanestosa, A., Brito-Argáez, L., González-Sánchez, A., Peraza-Sánchez, S. R., & Xingú-López, A. **De Planta Ornamental a Curativa: Atribuciones Medicinales del Amaranto Rojo (*Amaranthus cruentus* L.).** 1era Feria Yucatanense de la Medicina Tradicional Maya. 3 de noviembre de 2023. Mérida, Yucatán, México.
 6. Araujo-León, J. A., Sánchez-del Pino, I., Ortiz-Andrade, R., Brito-Argáez, L., Peraza-Sánchez, S. R., Xingú-López, A., & Aguilar-Hernández, V. **Efecto antihiper glucémico de *Amaranthus cruentus* L.: Elucidación Metabolómica y Farmacodinámica.** 19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. 22 al 25 de mayo de 2024. Cuernavaca, Morelos, México.
 7. Araujo-León, J. A., Sánchez-del Pino, I., Brito-Argáez, L., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., & Aguilar-Hernández, V. **Generación de una base de datos mediante huella dactilar betalánica por MS *in silico*: Identificación de betalaínas en pitaya roja.** 20a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. 21 al 24 de mayo de 2025. Mérida, Yucatán, México

Participación en eventos de divulgación

1. Participación en el Webinario “**Amaranto: Un Alimento Prehispánico con Alto Valor Nutricional en Creciente Consumo**” con la ponencia “**El Amaranto como Super Alimento del Tercer Milenio: Retos en el Control de Calidad desde una Perspectiva Quimiotaxonómica**” realizado el 24 de noviembre de 2021, a través de medios electrónicos.
2. Participación en el “**Teatro de la Ciencia**” en el marco de la **Semana Nacional del Conocimiento, Yucatán 2022: Ciencias Básicas para el Desarrollo Sostenible**, realizada del 17 al 21 de octubre de 2022.

-
3. Participación en “**CICY casa abierta 2023**” con la actividad “**El Mundo Mágico de las Macromoléculas**” realizado el 9 de noviembre de 2023.
 4. Participación en “**CICY casa abierta 2024**” con la actividad “**Moléculas Sabrosas: Explorando la Magia de Nuestros Sabores**” realizado el 24 de octubre de 2024.
 5. Reconocimiento por haber obtenido el **primer lugar** como mejor presentación de **Doctorado** durante el seminario de estudiantes de la **UBI 2024-I**, celebrado el 16 de julio de 2024.
 6. Participación en **Talento CICY 2024 – Modalidad Estudiantes de Secundaria** con el proyecto “**Sorpréndete con la milenaria planta de amaranto (Xtes)**,” celebrado del 12 al 23 de agosto de 2024.
 7. Reconocimiento por haber obtenido el **primer lugar** en **Talento CICY 2024 – Modalidad Estudiantes de Secundaria** con el proyecto “**Sorpréndete con la milenaria planta de amaranto (Xtes)**.”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
ANTECEDENTES	4
1.1. LA FAMILIA AMARANTHACEAE	4
1.2. EVIDENCIAS ARQUEOLÓGICAS RELACIONADAS CON EL USO DEL AMARANTO EN MÉXICO	4
1.3. GÉNERO <i>AMARANTHUS</i>	6
1.4. <i>AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS</i>	7
1.5. <i>AMARANTHUS HYBRIDUS</i>	10
1.6. <i>AMARANTHUS PALMERI</i> S. WATSON	12
1.7. <i>AMARANTHUS CRUENTUS</i> L.	13
1.8. METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA FAMILIA AMARANTHACEAE	16
1.9. METABOLÓMICA Y ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL AMARANTO	19
1.10. EFECTOS FARMACOLÓGICOS REPORTADOS PARA METABOLITOS PRESENTES EN AMARANTO	24
JUSTIFICACIÓN	28
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
BREVE RESUMEN DE LOS CAPÍTULOS	31
CAPÍTULO II	33
ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN <i>IN SILICO</i> POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y EL ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS) PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL BETALÁMICO: IDENTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS EN PITAYA ROJA	33
2.1. RESUMEN	33
2.2. INTRODUCCIÓN	34

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.3.1. <i>Reactivos químicos</i>	42
2.3.2. <i>Material vegetal</i>	42
2.3.3. <i>Extracción por MSPD (Matrix Solid-phase Dispersion)</i>	42
2.3.4. <i>Análisis e identificación de betalaínas utilizando UHPLC_UV-Vis-MS/MS Orbitrap.</i>	43
2.3.5. <i>Generación de la biblioteca de fragmentación In silico basada en MassFrontier</i>	44
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
2.4.1. <i>Diseño de la librería in silico de betalaínas utilizando el software MassFrontier</i>	44
2.4.2. <i>Huella dactilar por espectrometría de masas (MS) de las betalaínas utilizando betanina y betanidina</i>	47
2.4.3. <i>Identificación de betalaínas en el extracto de betabel</i>	50
2.4.4. <i>Identificación de betalaínas en el extracto de pitaya roja</i>	52
2.4.4. <i>Identificación de betalaínas desconocidas en el extracto de pitaya roja</i>	63
2.5. CONCLUSIONES	64
2.6. PERSPECTIVAS	65
CAPÍTULO III	66
DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE BETALAÍNAS EN AMARANTO ROJO (AMARANTHUS CRUENTUS L.) POR LC-MS	66
3.1. RESUMEN	66
3.2. INTRODUCCIÓN	66
3.3. METODOLOGÍA.....	69
3.3.1. <i>Material vegetal</i>	69
3.3.2. <i>Reactivos químicos</i>	69
3.3.3. <i>Extracción de las betalaínas de las hojas e inflorescencias de A. cruentus</i>	70
3.3.4. <i>Análisis por LC-MS con analizador LTQ-Orbitrap</i>	70
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
3.4.1. <i>Determinación de betalaínas en el material de referencia de remolacha roja</i>	71
3.4.2. <i>Identificación y cuantificación relativa de 43 betalaínas por LC-MS</i>	72
3.5. CONCLUSIONES	81
3.6. PERSPECTIVAS	82
CAPÍTULO IV	83

ANÁLISIS METABOLÓMICO POR HPLC PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS E INFLORESCENCIAS DE <i>AMARANTHUS CRUENTUS</i> L. Y SU POTENCIAL ANTIDIABÉTICO Y ANTIHIPERTENSIVO	83
4.1. RESUMEN	83
4.2. INTRODUCCIÓN	84
4.3. METODOLOGÍA.....	85
4.3.1. <i>Material vegetal</i>	85
4.3.2. <i>Reactivos químicos</i>	86
4.3.3. <i>Extracción de los fitoquímicos de las hojas e inflorescencias de A. cruentus</i>	86
4.3.4. <i>Análisis por HPLC-UV-DAD</i>	86
4.3.5. <i>Validación del método de HPLC-UV-DAD</i>	87
4.3.6. <i>Cuantificación de betalainas y betaxantinas por espectrofotometría</i>	88
4.3.6. <i>Cuantificación de compuestos fenólicos</i>	89
4.3.7. <i>Ensayo DPPH in vitro</i>	90
4.3.7. <i>Ensayo de inhibición de la actividad de la α-amilasa in vitro</i>	90
4.3.8. <i>Ensayo de inhibición de la actividad de la α-glucosidasa in vitro</i>	91
4.3.8. <i>Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) in vitro</i>	91
4.3.9. <i>Ensayo de tolerancia a la sacarosa in vivo</i>	92
4.3.10. <i>Estudio de acoplamiento molecular</i>	93
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	94
4.4.1. <i>Condiciones analíticas por HPLC-UV-DAD para la cuantificación de polifenoles</i>	94
4.4.2. <i>Validación del método por HPLC-UV-DAD</i>	95
4.4.3. <i>Cuantificación de polifenoles en Amaranthus cruentus</i>	97
4.4.4. <i>Cuantificación de betalainas en Amaranthus cruentus L</i>	99
4.4.5. <i>Cribado farmacológico in vitro, in vivo, ex vivo e in silico de A. cruentus</i>	102
4.5. CONCLUSIONES	114
4.6. PERSPECTIVAS	115
CAPÍTULO V	116
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	116
5.1. <i>Discusión</i>	116
5.2. <i>Conclusiones generales</i>	118
5.3. <i>Perspectivas</i>	119

BIBLIOGRAFÍA	120
ANEXO I	146
ANEXO II	149

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L alrededor del mundo (Das, 2016).....	8
Figura 2. Distribución de <i>Amaranthus hybridus</i> L alrededor del mundo (Das, 2016).	11
Figura 3. Distribución de <i>Amaranthus palmeri</i> L., alrededor del mundo (EPPO Global Data Base).	13
Figura 4. Distribución mundial de <i>Amaranthus cruentus</i> L. (Das, 2016).	15
Figura 5. Estructuras representativas de betalaínas (Polturak & Aharoni 2018).	19
Figura 6. Integración de las disciplinas “ómicas” en una célula (Hernández Galicia, 2014).....	20
Figura 7. Pasos indispensables en el análisis metabolómico (Jang <i>et al.</i> , 2018).	21
Figura 8. (A) Separación por LC para ingresar al proceso de ionización en MS, (B) Resolución en MS para distinguir metabolitos similares, (C) LC permite la separación de isómeros o moléculas con similitud de afinidad o estructuras químicas parecidas, (D) Experimentos de MS/MS permiten aumentar la selectividad del análisis (Jang <i>et al.</i> , 2018).	22
Figura 9. Visualización comparativa de los niveles de metabolitos (Guo <i>et al.</i> , 2018).	23
Figura 10. Los metabolitos secundarios del amaranto pueden ayudar a restablecer el equilibrio entre el estrés oxidativo y la defensa antioxidante (Tang & Tsao, 2017).	25
Figura 11. Efectos antiinflamatorios de los metabolitos secundarios en el amaranto (Tang y Tsao, 2017).	26
Figura 12. Estrategia experimental implementada en la presente tesis para la determinación del metaboloma, efecto <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en un modelo farmacológico antidiabético, vasorelajante y aproximación farmacodinámica <i>in silico</i>	30
Figura 13. Esqueleto base de: (A) betacianinas y (B) betaxantinas.	35
Figura 14. Ruta biosintética de betalaínas (Polturak y Aharoni, 2018).	36

Figura 15. Modelo propuesto de biosíntesis de tirosina y betalaína en: A) remolacha roja y B) remolacha amarilla (Wang <i>et al.</i> , 2017).....	37
Figura 16. Derivados químicos de betanina producidos por (1) descarboxilación y (2) deshidrogenación (Xie & Chen, 2021).....	38
Figura 17. Gráfica de las clases de betalaínas utilizadas en la biblioteca espectral. (A) Tipos de betalaína; (B) tipos de betacianina; y (C) tipos de betaxantina (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).	45
Figura 18. Distribución de las masas de los aductos $[M+H]^+$ de las betaxantinas y betacianinas (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).....	46
Figura 19. Identificación de la betanina y su epímero isobetanina. (A) Estructura química de la betanina y la isobetanina. (B) Extracto del cromatograma obtenido para el ion m/z 551,1495 (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).....	47
Figura 20. Espectro de masas MS/MS de la betalaina. (A) Espectro MS/MS del ion m/z 551,1495 fragmentado con HCD de alta energía a 50 eV. (B) Espectro MS3 obtenido con el ion con m/z 389,09 fragmentado con CID a 35 eV (551,1495 CID35 \rightarrow 389 CID35 \rightarrow) (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).....	49
Figura 21. Espectros de masas de derivados de betacianina con HCD a 50 eV. (A) Espectro MS/MS de 2-descarboxi-betanina. (B) Espectro MS/MS de 2-descarboxi-neobetanina. Los iones centrales están resaltados en negro (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).....	51
Figura 22. Espectros de masas de dos betaxantinas con HCD a 50 eV. (A) Espectro MS/MS de glutamina-bx. (B) Espectro MS/MS de triptófano-bx. Los iones centrales están resaltados en negro (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).....	52
Figura 23. Resolución de las betalaínas observadas en la pitaya roja. (A) La escala del círculo de color indica el cambio en el área medida del pico en la base del ion parental ($[M+H]^+$) para las betalaínas. (B) Cromatograma de la pitaya roja a 540 nm. El pico muestra el tiempo de retención y el número de etiqueta de la betalaína. La Tabla 2 contiene la lista completa de betalaínas identificadas (Araujo-León <i>et al.</i> , 2024b).....	54
Figura 24. Espectros de masas de la betacianina Nueva-2. (A) Espectro MS/MS obtenido con fragmentación del ion m/z 827.23 con HCD. (B) Espectro MS/MS obtenido con el ion m/z 827.23	

fragmentado con CID a 35 eV. (C) Espectro MS3 obtenido con el ion m/z 695.19 fragmentado con CID a 35 eV (827.23 CID35 \rightarrow 695.19 CID35 \rightarrow). (D) Espectro MS4 obtenido con fragmentación del ion m/z 551.15 con CID a 35 eV (827.23 CID35 \rightarrow 695.19 CID35 \rightarrow 551.15 CID35 \rightarrow). Los iones conservados de las betalaínas están resaltados en negro (Araujo-León *et al.*, 2024b)..... 64

Figura 25. Clasificación integral de los pigmentos de betacianinas (Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021)..... 68

Figura 26. Análisis por LC-MS del material de referencia de remolacha roja. A) Cromatograma a 540 nm. Espectros MS2 obtenido a 50 eV en HCD del B) pico a 3.93 min (betanina) y C) pico a 6.76 min (isobetanina) (Araujo-León *et al.*, 2023b). 72

Figura 27. *Amaranthus cruentus* L., accesión “amaranto rojo” (Araujo-León *et al.*, 2023b). 73

Figura 28. Análisis por LC-MS de muestras de “amaranto rojo”. A) Cromatograma a 540 nm de hojas y B) inflorescencias. C) Espectros de MS1 obtenidos para el primer pico. D) Espectro de MS2 obtenido para el segundo pico con una colisión a 50 eV por HCD (Araujo-León *et al.*, 2023b). 74

Figura 29. Estructuras químicas de las principales betalaínas encontradas en el “amaranto rojo” (*Amaranthus cruentus* L.) (Araujo-León *et al.*, 2023b). 75

Figura 30. Abundancias relativas de las principales betalaínas observadas en “amaranto rojo”. A) betacianinas y B) betaxantinas determinadas bajo una transformación \log_{10} del área de los picos (Araujo-León *et al.*, 2023b)..... 80

Figura 31. Cromatograma obtenido por HPLC-UV-DAD a 540 nm y 230 nm de los estándares analíticos para la cuantificación de betalaínas, flavonoides, ácidos cinámicos y ácidos benzoicos (Araujo-León *et al.*, 2024a). 95

Figura 32. Cromatogramas graficados a 230 nm de las muestras de hojas (A) e inflorescencias (B). Los picos etiquetados del 1 al 12 corresponden a los fitoquímicos con la misma etiqueta en la Figura 31 (Araujo-León *et al.*, 2024a). 98

Figura 33. Composición química de polifenoles y betalaínas en hojas e inflorescencias de *A. cruentus*. (A) Mapa de calor de las concentraciones de polifenoles; (B) contenido total de

polifenoles incluyendo flavonoides, ácidos benzoicos y ácidos cinámicos; (C) contenido total de betalaínas, que comprende tanto betacianinas como betaxantinas (Araujo-León *et al.*, 2024a).

..... 99

Figura 34. Resultados de la prueba de captación de radicales DPPH de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2024a). 103

Figura 35. Comparación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa y α -amilasa en extractos de hoja e inflorescencia de *A. cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2024a). 105

Figura 36. Análisis estructural e interacción de enzimas humanas clave con inhibidores, acompañado de diagramas de interacción 2D. (A) Maltasa-glucoamilasa unida con acarbosa (amarillo) e isoamarantina (-9.1 kcal/mol, cian). (B) Interacción de sucrasa-isomaltasa con kotalanol (amarillo) e isogomphrenin-I (-9.0 kcal/mol, salmón). (C) Alpha Amilasa pancreática conjugada con acarbosa (amarillo) e isoamarantina (-11.9 kcal/mol, cian). (D) Enzima convertidora de angiotensina conjugada con lisinopril (amarillo) y catequina (-9.9 kcal/mol, verde) (Araujo-León *et al.*, 2024a). 108

Figura 37. Prueba de tolerancia a la sacarosa por vía oral en un modelo murino normoglucémico utilizando extractos de hojas e inflorescencias de *Amaranthus cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2024a). 110

Figura 38. Efecto vasodilatador de los extractos de *A. cruentus* de hojas e inflorescencias. A) Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina y B) Curvas de respuesta de concentración del efecto vasorrelajante: E+: con endotelio y E-: sin endotelio (Araujo-León *et al.*, 2024a). .. 113

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en la familia Amaranthaceae empleando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (Steffensen <i>et al.</i> 2011).....	18
Tabla 2. Datos cromatográficos y espectrométricos de las betalaínas observadas en el extracto de <i>Hylocereus costaricensis</i>	55
Tabla 3. Datos cromatográficos y espectrométricas de las betalaínas en “amaranto rojo”.	76
Tabla 4. Control de calidad para los fitoquímicos evaluados en “amaranto rojo”	95
Tabla 5. Precisión y recuperación de 12 fitoquímicos en tres concentraciones diferentes.....	97
Tabla 6. Resultados de ΔG (kcal/mol) <i>in silico</i> del cribado enzimático.	107

ABREVIATURAS

DAD	Detector de Matriz de Diodos (Diode Array Detector, por sus siglas en inglés)
EROs	Especies Reactivas al Oxígeno
EUA	Estados Unidos de América
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés)
HCD	Disociación por Colisión de Alta Energía (Higher-energy Collisional Dissociation, por sus siglas en inglés)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés)
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (High-Resolution Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés)
LC-MS	Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés)
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas en Tándem (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés)
<i>m/z</i>	Relación Masa/Carga (Mass-to-Charge Ratio, por sus siglas en inglés)
MS	Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés)
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tándem (Tandem Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés)
MSDP	Dispersión de Matriz en Fase Sólida (Matrix Solid-Phase Dispersion, por sus siglas en inglés)
Orbitrap	Tipo de espectrómetro de masas de alta resolución de trampa orbitrante
ppm	partes por millón
RNM	Resonancia Magnética Nuclear
SNICS	Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas
<i>t_R</i>	Tiempo de Retención (Retention Time, por sus siglas en inglés)
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (Ultra High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés)
UV-DAD	Detector de Matriz de Diodos Ultravioleta (Ultra Violet-Diode Array Detector, por sus siglas en inglés)

RESUMEN

Introducción: El amaranto ha sido cultivado desde épocas prehispánicas, los aztecas lo consideraban un alimento sagrado y lo usaban en ceremonias religiosas. Actualmente, el amaranto sobresale por su valor nutricional, especialmente por su alto contenido de proteínas y aminoácidos como la lisina, presente incluso en mayores concentraciones que en la leche. Una especie relevante es *Amaranthus cruentus* L., por sus tonalidades rojo-violetas atribuibles a betalaínas y polifenoles, compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Sin embargo, la información sobre su metaboloma y su potencial farmacológico aún es limitada. **Objetivo:** Determinar el perfil metabolómico de las inflorescencias y hojas de *A. cruentus* mediante técnicas de LC-MS/MS Orbitrap y HPLC-UV-DAD, así como evaluar la relación de sus metabolitos con efectos antihipertensivos y antidiabéticos en modelos farmacológicos experimentales. **Metodología:** Se cultivaron plantas de *A. cruentus* en invernaderos del CICY. Se recolectaron hojas e inflorescencias y se extrajeron metabolitos por MSPD con C18. Los extractos fueron analizados por LC-MS/MS Orbitrap para identificar betalaínas, y por HPLC-UV-DAD para cuantificar polifenoles. Se evaluaron los extractos metanólicos acuosos en modelos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* para estudiar su efecto sobre la glucosa y la presión arterial. Además, se aplicó modelado *in silico* para analizar la interacción de metabolitos con enzimas clave. **Resultados:** Las betalaínas se identificaron mediante una metodología analítica por LC-MS/MS HRMS Orbitrap desarrollada con materiales de referencia: *Beta vulgaris* L. y *Selenicereus* sp. Se identificaron 86 betalaínas (31 betacianinas, 36 derivados y 19 betaxantinas). Por modelado *in silico* se generaron patrones de fragmentación para 140 betalaínas. En *A. cruentus* se identificaron 43 betalaínas (30 betacianinas y 13 betaxantinas) y 12 polifenoles (7 flavonoides, 2 ácidos benzoicos y 3 cinámicos). Las inflorescencias presentaron mayor cantidad de betalaínas y pocas cantidades de polifenoles, mientras que las hojas mostraron el patrón inverso. Los ensayos *in vitro* evidenciaron inhibición de enzimas relacionadas con la glucosa y la presión arterial. En modelos murinos, los extractos mostraron efecto antihiper glucémico y vasorrelajación en aorta. El modelado *in silico* confirmó la interacción de betalaínas y polifenoles con dianas terapéuticas. **Conclusiones:** Esta tesis presenta la primera caracterización del metaboloma de *A. cruentus*, destacando su contenido en betalaínas y polifenoles y la relación con su actividad farmacológica y su relación como alimento funcional para coadyuvar a la prevención de enfermedades como la diabetes e hipertensión. Estos hallazgos permiten generar nuevas perspectivas y escenarios científicos para su aplicación en formulaciones nutraceuticas y farmacológicas.

ABSTRACT

Introduction: Amaranth has been cultivated since prior Spaniards' arrival; the Aztecs considered it sacred and used it in religious theophagic practices. In recent years, amaranth has drawn attention due to its high nutritional value, notably its protein and amino acid content, especially lysine, which exceeds that found in milk. Among the most studied species is *Amaranthus cruentus* L., recognized for its red-violet coloration, attributed to betalains and polyphenols, bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties. Despite known health benefits, studies on its metabolomic profile and pharmacological interactions remain limited. **Aim:** This study aimed to determine the metabolomic profile of *A. cruentus* inflorescences and leaves using LC-MS/MS Orbitrap and HPLC-UV-DAD techniques and to evaluate the correlation between its metabolites and antihypertensive and antidiabetic effects in experimental pharmacological models. **Methodology:** *A. cruentus* plants were cultivated under controlled conditions at CICY. Leaves and inflorescences were harvested, and metabolite extraction was performed using MSPD with C18. Extracts were analyzed via LC-MS/MS Orbitrap for betalain identification and HPLC-UV-DAD for polyphenol quantification. Aqueous methanolic extracts were then tested *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* in murine models to assess effects on glucose homeostasis and blood pressure. *In silico* modeling was also conducted to examine interactions with key metabolic enzymes. **Results:** An LC-MS/MS HRMS Orbitrap methodology was developed using *Beta vulgaris* L. and *Selenicereus* sp. as references, identifying 86 betalains (31 betacyanins, 36 derivatives, 19 betaxanthins). *In silico* analysis generated fragmentation patterns for 140 betalains (112 betacyanins, 28 betaxanthins), identifying conserved ion signatures. In *A. cruentus*, 43 betalains (30 betacyanins, 13 betaxanthins), and 12 polyphenols (7 flavonoids, 2 benzoic acids, 3 cinnamic acids) were identified. Inflorescences were rich in betalains and low in polyphenols, while leaves showed the opposite pattern. *In vitro* assays confirmed enzyme inhibition relevant to glucose and blood pressure regulation. *In vivo* models showed hypoglycemic effects; *ex vivo* tests revealed vasorelaxation in murine aorta. *In silico* modeling supported metabolite-enzyme interactions. **Conclusions:** This study presents the first comprehensive characterization of the metabolome of *A. cruentus*, highlighting its betalain and polyphenol content and their relationship with its pharmacological activity. These findings support the classification of *A. cruentus* as a functional food with potential applications in preventing and managing diabetes and hypertension. Furthermore, these results open new scientific perspectives for its incorporation into nutraceutical and pharmaceutical formulations.

INTRODUCCIÓN

El amaranto (*Amaranthus* L.) ha sido reconocido como un cultivo de gran importancia desde tiempos prehispánicos hasta la actualidad. Fue considerado sagrado por los aztecas, al utilizarse en ceremonias y rituales religiosos con prácticas teofágicas (Araujo-León *et al.*, 2023a; Velasco, 2016). Entre las especies de mayor relevancia económica por la producción de grano se encuentran *A. hypochondriacus* L., *A. caudatus* L. y *A. cruentus* L. (Stetter *et al.*, 2019), siendo esta última de particular interés debido a su excepcional perfil nutricional. *Amaranthus cruentus* destaca por su alto contenido en proteínas, aminoácidos esenciales, fibra, minerales, polifenoles y betalaínas, lo que ha impulsado su estudio como un potencial alimento funcional (Araujo-León *et al.*, 2022, 2023a; Espitia Rangel *et al.*, 2010).

En Yucatán, el amaranto es conocido como *Xtes*, y se han registrado 11 especies que son consideradas maleza, con un consumo casi nulo. La propagación de estas especies en la península de Yucatán ha ocurrido de manera natural, sin intervención humana, ya que no poseen un valor comercial reconocido en la región. Esto ha llevado a que sean subvaloradas y subutilizadas, a pesar de sus propiedades nutricionales y medicinales (García-López *et al.*, 2021; Sánchez-del Pino *et al.*, 2019).

Durante la recolección de especies en Yucatán, específicamente en el municipio de Peto, observamos plantas de amaranto en floración con tonalidades rojas en tallos, hojas e inflorescencias. La comunidad local destacó su uso en ofrendas para altares durante el día de muertos, en la celebración maya de *Hanal Pixán*. La población yucateca tiene conocimiento de los *Xtes* no solo en el ámbito culinario, sino también en prácticas religiosas y medicinales (García-López *et al.*, 2021; Sánchez-del Pino *et al.*, 2019). Sin embargo, esta información no ha sido claramente documentada, lo que resalta la importancia de la investigación social y científica sobre los amarantos en Yucatán.

Los amarantos contienen diversos fitoquímicos con propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas antihipertensivas y antioxidantes (Araujo-León *et al.*, 2022; Joshi *et al.*, 2018; Tang y Tsao, 2017). Estos últimos son capaces de neutralizar las especies reactivas de oxígeno (EROs). Se conoce que el estrés oxidativo es causado por el desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad antioxidante, lo que puede provocar daño celular y contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas como diabetes e hipertensión (Wang *et al.*, 2018; Tang y Tsao, 2017). Por lo tanto, el amaranto se posiciona como alimento prometedor para la prevención de estas

enfermedades. Sin embargo, los estudios relacionados con el perfil fitoquímico y la relación con sus propiedades farmacológicas son limitados en la literatura.

Las betalaínas son pigmentos nitrogenados responsables de la coloración de las inflorescencias, hojas y tallos del amaranto. Las principales betalaínas identificadas en *A. cruentus* son la amarantina y su epímero isoamarantina. Estudios recientes han demostrado una diversidad aún mayor de betalaínas presentes en hojas e inflorescencias de *A. cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2023b). Además, se ha documentado que los amarantos contienen polifenoles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, taninos y ligninas, compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y farmacológicas (Tang y Tsao, 2017). La importancia de los polifenoles en la actividad farmacológica y la caracterización fitoquímica específica de *A. cruentus* no se encontraba documentada en la literatura, hasta hace apenas que en estudios recientes, no sólo se ha documentado la relevancia de los polifenoles, sino que también se ha demostrado la heterogeneidad de las betalaínas en hojas e inflorescencias y la relación de ambos grupos en la modulación de enzimas claves en la diabetes e hipertensión (Araujo-León *et al.*, 2024a). Estos aportes respaldan el uso de *A. cruentus* como alimento funcional o en la formulación de nutraceuticos (Gresta *et al.*, 2020).

La presente tesis tuvo como objetivo explorar el perfil metabólico de las inflorescencias y hojas de *A. cruentus* y su relación con la actividad antidiabética y antihipertensiva. Para ello, se desarrolló una metodología por LC-MS/MS Orbitrap para la determinación de betalaínas; debido a la falta de estándares analíticos, empleamos un modelo *in silico* para resolver las rutas de fragmentación de las betalaínas y observar los iones conservados entre las betacianinas, derivados de betacianinas y betaxantinas (Araujo-León *et al.*, 2024b). Para la identificación de polifenoles, se desarrolló y validó una metodología por HPLC-UV-DAD que, junto con las evaluaciones farmacológicas en modelos de murinos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*, permitió determinar el potencial terapéutico de *A. cruentus* y trazar una ruta farmacodinámica que modula el mecanismo de acción en procesos metabólicos y cardiovasculares (Araujo-León *et al.*, 2024a).

Este trabajo contribuye al conocimiento sobre la composición química y bioactividad de *A. cruentus*, proporcionando evidencia científica que no se había documentado previamente. Además, permite proponer a *A. cruentus* como un alimento funcional auxiliar en el manejo preventivo de la diabetes y la hipertensión. Finalmente, este trabajo sienta las bases para el desarrollo de nuevas formulaciones nutraceuticas dirigidas a la prevención de enfermedades metabólicas.

Finalmente, la tesis se estructuró en capítulos que abordan de manera progresiva los objetivos específicos planteados. En el Capítulo II, se describe el desarrollo y validación de un método analítico basado en dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para la extracción e identificación de betalainas, lo cual permitió la creación de una base de datos ampliada de estos compuestos. El Capítulo III aplica dicha metodología al estudio de *Amaranthus cruentus* (“amaranto rojo”), identificando 43 betalainas no reportadas previamente. El Capítulo IV profundiza en la caracterización del metaboloma del amaranto rojo, incorporando flavonoides, ácidos orgánicos y cinámicos, y presenta su evaluación farmacológica mediante ensayos in vitro, in vivo, ex vivo e in silico en modelos de diabetes e hipertensión. Finalmente, el Capítulo V integra la discusión general, las conclusiones y las perspectivas del trabajo.

CAPÍTULO I**ANTECEDENTES****1.1. La familia Amaranthaceae**

La familia Amaranthaceae corresponde al orden Caryophyllales el cual es uno de los órdenes más naturales y claramente definidos dentro de las angiospermas. Amaranthaceae pertenece a un clado junto con Chenopodiaceae. Este sustento se basa en un apoyo monofilético, en el que han evolucionado a partir de una población ancestral común, en la alianza “Amaranthaceae – Chenopodiaceae” que es consistente en los análisis filogenéticos moleculares realizados hasta la fecha (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015). Esta familia se encuentra distribuida a lo largo del planeta. No obstante, la mayor diversidad se encuentra entre los trópicos y el ecuador. Las regiones con mayor número de especies son: África, principalmente en la zona cercana al sur del desierto del Sahara y la parte medular del continente; América del Norte, principalmente en México; América Central y América del Sur, que es donde se encuentra la mayor representatividad de esta familia en las zonas tropicales y subtropicales. La familia está formada aproximadamente por 174 géneros y alrededor de 2,050 a 2,500 especies, siendo la familia Amaranthaceae la de mayor diversidad dentro del orden Caryophyllales, además de incluir cerca del 50% de las especies de eudicotiledóneas con ruta C4 de la fotosíntesis (Sandoval-Ortega *et al.*, 2017).

1.2. Evidencias arqueológicas relacionadas con el uso del Amaranto en México

Existen evidencias arqueológicas encontradas en México que concluyen que habitantes de América Prehistórica utilizaron hojas y semillas del género *Amaranthus*, incluso mucho antes del proceso de domesticación, determinando que el hombre ya cultivaba esta planta durante la fase Coxcatlán que va desde los años 5200 a 3400 a.C., apoyando así que la domesticación del amaranto tuvo lugar en la misma época que el maíz. Algunos estudios arqueobotánicos realizados en las cuevas de Valle de Tehuacán, Puebla, demostraron que nuestros ancestros cultivaron, entre los años 9000 a 5000 a.C., un mayor número de plantas comestibles en comparación con sus contemporáneos europeos (Espitia Rangel *et al.*, 2010).

Los probables progenitores silvestres de las especies cultivadas se distribuyen a lo largo de extensos territorios por América, específicamente entre los trópicos y las zonas templadas. La evidencia ceremonial de las civilizaciones prehispánicas propone que además del maíz, frijol, calabaza, maguey, nopal y chile, el amaranto fue usado con dichos propósitos más allá de un

recurso básico. Con los datos arqueobotánicos en el estudio del amaranto, se ha logrado concluir que esta planta se ha cultivado extensamente antes de la llegada de los españoles. La conquista de los españoles permitió la expansión de este cultivo en y al norte de Mesoamérica (Espitia Rangel *et al.*, 2010).

Los antiguos mesoamericanos encontraron en el amaranto (en náhuatl: *huauhtli*), uno de los alimentos más versátiles y nutritivos del continente americano. El *huauhtli* tiene una historia de miles de años como parte de la agricultura y la gastronomía, pero también de la ritualidad del México antiguo. Los frailes españoles documentaron en sus crónicas en el siglo XVI, la amplia variedad de platillos que los mexicas elaboraban con *huauhtli*. Sin embargo, resalta el protagonismo de las semillas de amaranto en las prácticas religiosas, como base para la elaboración de las imágenes sagradas de los dioses. El cultivo del amaranto ha sido mantenido y reivindicado por los pueblos indígenas actuales, dándonos una nueva oportunidad para su estudio científico desde diferentes áreas (Araujo-León *et al.*, 2023a).

Para los mexicas, las montañas tenían un simbolismo muy importante dentro de la cosmovisión y las prácticas religiosas. Las montañas guardaban en su interior las aguas que el dios Tláloc hacía caer en forma de lluvia para la agricultura (Broda y Béz, 2001). Las montañas poseían atributos especiales como el *Tonacatépetl* o montaña de los mantenimientos, de la cual surgían todas las cosas buenas y nutritivas para el hombre (Matos, 2010). Los rasgos de la orografía también eran considerados importantes para designar lugares sagrados por haber sido escenario de eventos mitológicos, como el nacimiento de los dioses o el surgimiento mismo de la tierra firme durante la creación del cosmos (Morante, 2001). Para venerar a las montañas sagradas, los mexicas tenían dos festividades: 1) *panquetzaliztli* y 2) *atemoztli*, en las cuales se elaboraban imágenes con pasta de amaranto, maíz tostado y miel de maguey, a lo que se le denominaba *tzoalli* (Durán, 1948). En el mes de *tepéilhuitl* se veneraba a las montañas más importantes, para lo cual se preparaban imágenes de *tzoalli* con forma de serpiente, llamadas *ecatontontli*, a las que se les ofrecían sacrificios de comida e incluso sacrificios humanos (Sahagún, 2013). Durante el mes de *atemoztli*, se realizaban las festividades del dios de la lluvia Tláloc, el rito central consistía en la veneración de imágenes de montañas antropomorfizadas hechas de *tzoalli*, a las cuales se les ponían pepitas representando los dientes y frijoles para representar a los ojos. Estas imágenes eran literalmente “sacrificadas” ya que, utilizando el huso del telar de cintura, se les extraía el corazón y se les cortaba la cabeza. Las piezas de las imágenes eran repartidas entre los asistentes para ser ingeridas, con lo que se daba inicio al banquete con el que finalizaba la festividad (Sahagún, 2013). Cabe mencionar que, estos rituales sobreviven

hasta la actualidad en las prácticas religiosas de los nahuas de la Sierra de Guerrero, quienes aún hoy en día realizan ceremonias con imágenes hechas de *tzoalli* como elemento central (Villela, 2016).

Sin embargo, con la llegada de los colonizadores españoles y la evangelización, los rituales, los dioses y las idolatrías fueron lentamente desplazadas. Hecho que llevó a censurar y subestimar algunos de los cultivos sagrados, entre ellos el amaranto, dejando de lado la importancia simbólica en la cosmovisión de Mesoamérica (García-López *et al.*, 2021). Los españoles llamaban “bledo” al amaranto, por considerarlo de poco valor e incluso una mala hierba en los cultivos, además de su asociación con los rituales paganos. Contrariamente a lo que se podría pensar, la planta no fue prohibida, ya que no se ha encontrado ninguna disposición jurídica de la época virreinal al respecto (Velasco, 2016). Los mexicas tenían conocimiento que el *huauhtli* además de ser un alimento sagrado, podía ser preparado en diferentes presentaciones como atoles (*tzoalli*), tamales (*huauquiltamalli*) y de otras maneras, ya que, de manera empírica, demostraba ser un alimento con amplias propiedades nutricionales bastas para satisfacer el hambre. También eran aprovechadas las hojas del amaranto nombradas *quilit* (quelites) que denominaba a la hoja comestible como planta tierna (García-López *et al.*, 2021).

Las muestras arqueológicas de amaranto más antiguas en México proceden de la cueva Coxcatlán, ubicada en el valle de Tehuacán, Puebla. Los restos de amaranto corresponden a inflorescencias y semillas desecadas, datadas para el 5400 a.C., correspondiente a la fase “El Riego”. En estas muestras se identificaron las especies de amaranto, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus hypochondriacus*, las cuales corresponden a las especies modernas más comunes, así como *Amaranthus* sp., cuya especie no pudo ser identificada (McClung, 2016). En el valle de México la muestra más antigua procede de Zohapilco Tlapacoya, datada para el 5000 a.C., sin embargo, no se pudo identificar la especie, ya que se trataba de semillas carbonizadas. (McClung *et al.*, 2014). El amaranto se encontró en otros sitios arqueológicos del valle de México como Teotihuacán, Tlatelolco, Itztapalapa, en ofrendas en el Templo Mayor de Tenochtitlan, entre otros, abarcando todos los horizontes cronológicos de la historia mesoamericana (McClung *et al.*, 2014, McClung, 2016).

1.3. Género *Amaranthus*

El genero *Amaranthus* comprende hierbas anuales, monoicas o dioicas con tallos postrados, erectos, ascendentes o infrecuentemente decumbentes, simples a muy ramificados,

glabros a biliosos, tricomas pluricelulares, blanquecidos o amarillentos que pueden ser simples o espiralados (Espitia Rangel *et al.*, 2010; Sánchez del Pino *et al.*, 1999).

Las hojas son alternas, suelen ser coriáceas a membranáceas y algunas veces suculentas, glabras, vilosas o vilosas-glandulares en el envés. En el margen entero se observa ligeramente sinuado y la base redondeada a deltoide o puede estar atenuada, en ocasiones este puede ser asimétrico, sésiles a pecioladas. Las inflorescencias son de tipo espigas generando racimos o panículas; bráctea floral y bractéolas amarillo-verdosas o con tonalidades pardo-oscuros a rojizas. Las flores suelen ser imperfectas en su mayoría y sésiles (Espita Rangel *et al.*, 2010; Sánchez del Pino *et al.*, 1999).

Amaranthus consiste en más de 75 especies actualmente reconocidas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015), de las cuales 40 crecen en América, y el resto se desarrolla en Australia, África, Asia y Europa, las cuales tiene un origen monofilético y constituyen un linaje con metabolismo C4. En América del Norte habita un total de 29 especies, de las cuales 16 son de amplia distribución y 13 endémicas de México. Por su valor comercial y nutricional, *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus*, *A. hybridus*, *A. hypochondriacus*, y *A. retroflexus* han sido las especies del género más estudiadas en México y consideradas en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). Sin embargo, la clasificación taxonómica se ha basado únicamente en características morfológicas, debido a la falta de estudios taxonómicos y filogenéticos moleculares exhaustivos, a pesar de la importancia económica del género, que contiene pseudocereales y cultivos verdes, plantas ornamentales populares y hierbas invasoras y nocivas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015), además, ha sido difícil su circunscripción a nivel de especie debido a la alta variabilidad fenotípica (Iamónico, 2015). A pesar de que la composición y la distribución de los pigmentos es una de las características fenotípicas más afectadas por la interacción de la planta con el ambiente, no han sido estudiados en profundidad. Adicionalmente, la búsqueda de características que permitan o faciliten la identificación de las especies, ha llevado a indagar en los caracteres reproductivos y vegetativos (Costea *et al.*, 2001; Espita Rangel *et al.*, 2010).

1.4. *Amaranthus hypochondriacus*

Acerca del cultivo y usos: El cultivo y desarrollo de *Amaranthus hypochondriacus* se remonta al Imperio Azteca, donde fue una de las principales especies cultivadas por su valor alimenticio y ritual. Actualmente, su cultivo sigue vigente en diversas regiones del mundo,

especialmente en América Latina y Asia. Además, su producción para la generación de biomasa se ha extendido a regiones como India, donde se ha investigado su potencial como cultivo alternativo para la producción de grano y forraje (Das, 2016; Rastogi y Shukla, 2013).

Acerca del grano y semilla: *Amaranthus hypochondriacus* se distingue por la producción de granos más robustos y un alto rendimiento en comparación con otras especies del género *Amaranthus*. Sus semillas, son de tamaño pequeño y de alto valor nutricional, además, presentan una excelente calidad y pueden ser utilizadas como ingrediente en la industria alimentaria, destacándose por su contenido de proteínas, lípidos esenciales y compuestos bioactivos con propiedades nutraceuticas (Das, 2016; Venskutonis y Kraujalis, 2013).

Distribución: La especie presenta una amplia distribución alrededor de los trópicos, América Central y del Norte. También se han documentado su distribución por Asia, en específico en países como Nepal y la India. La especie es apta para el cultivo en áreas tropicales de grandes altitudes y condiciones secas (Figura 1) (Das, 2016; Stetter *et al.*, 2019).

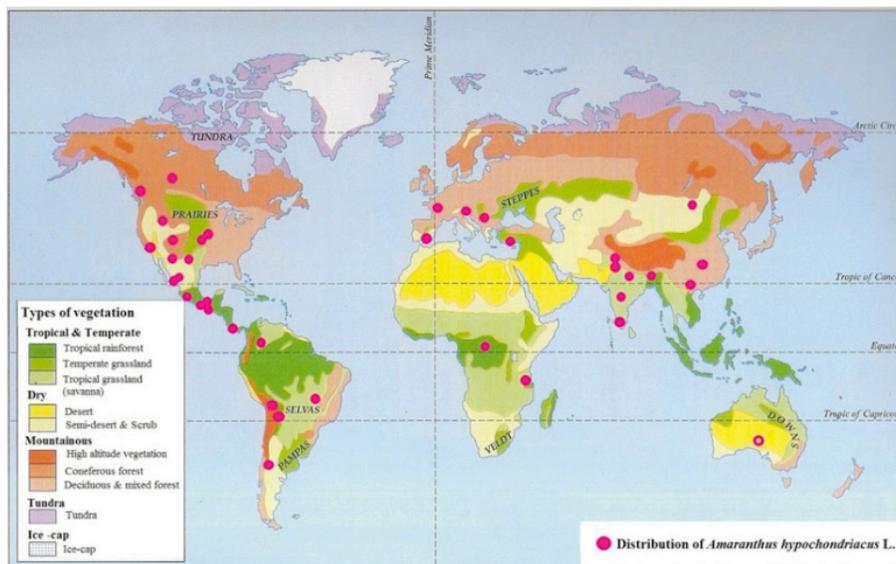


Figura 1. Distribución de *Amaranthus hypochondriacus* L alrededor del mundo (Das, 2016).

Centro de domesticación: Evidencias arqueobotánicas y genéticas indican que *Amaranthus hypochondriacus* fue domesticado en el centro de México a partir de *A. hybridus*, con registros de su uso desde hace más de 4,000 años (Sauer, 1967; Brenner *et al.*, 2000).

Historia: El grano de amaranto fue llevado a Europa por medio de los españoles durante la conquista de América, en los siglos XVI y XVII. A la llegada de *A. hypochondriacus* a Europa alrededor del año 1700, fue aceptado y se expandió por Europa central y Rusia como un cereal secundario o como planta ornamental. A principios del siglo XIX, fue llevado a África y Asia, y en la actualidad se cultiva como cereales en regiones muy dispersas del mundo como las montañas de Etiopía, las colinas del sur de la India, el Himalaya de Nepal y las llanuras de Mongolia (Das, 2016).

Nombre común: Esta especie es conocida como “pluma de príncipe” (Das, 2016, Saur, 1967).

Características morfológicas: Es una planta herbácea anual, erecta, glabra o moderadamente pubescente en la porción distal, que en la madurez a menudo se vuelve glabrescente, alcanzando hasta tres metros de altura. Los tallos son de color verde o púrpura en tonos rojizos, ramificados, principalmente en la inflorescencia, hasta casi simples en la parte proximal. Las hojas se caracterizan por ser simples, pecioladas, los pecíolos de las hojas distales son iguales o ligeramente más cortos que la hoja, se alargan proximalmente. Las inflorescencias son muy grandes, robustas, predominantemente en panícula o espigas erectas de color rojo oscuro a tonos violetas, también es posible observarlas con coloraciones amarillas o tonalidades verdosas, sin hojas al menos en la parte distal, espinosas y rígidas. Las brácteas son lanceoladas a lineales-subuladas, espinescentes, el tamaño es dos veces más largas que los tépalos y ramas, con una textura rígida. Las flores pistiladas tienen cinco tépalos y los tépalos son ligeramente recurvados, los proximales lanceolados, los distales estrechamente ovados-elípticos a elípticos, desiguales a ocasionalmente subiguales; los tépalos internos son más cortos que los tépalos externos, con un ápice agudo a acuminado; los tépalos son comparativamente más grandes que otras especies de granos. Las semillas son de color blanco, blanco rosado o negro a marrón rojizo oscuro, subglobosas a lenticulares, de 1 a 1.4 mm de diámetro, de textura lisa y brillantes (Costea, 2012; Das, 2016).

1.5. *Amaranthus hybridus*

Acerca del cultivo y usos: Las hojas de *A. hybridus* se utilizan especialmente para los dolores de estómago, la diarrea y la disentería, así como verdura, y para preparación de alimentos para pacientes convalecientes. El quelite es una especie poco valorada, a pesar de su alto potencial, por ejemplo, comparado con otras especies comestibles de fuentes tradicionales, el amaranto sobresale por contener concentraciones elevadas de ácidos grasos omega 3 y proteína total (Ogwu, 2020). La reproducción de *A. hybridus* es generalmente por semilla, con un ciclo de vida anual de verano, su ciclo lo lleva a cabo entre marzo y diciembre, pasando en los meses de marzo a septiembre bajo un estadio vegetativo y entre mayo y octubre un estadio reproductivo, para dar frutos entre julio y diciembre (Zea Ramos, 2016).

Acerca del grano y semilla: Las semillas de *Amaranthus hybridus* son negras y brillantes o pálidas, comprimidas, con un diámetro de 0.75–1.25 mm. Presentan un espermoderma liso en la parte central y débilmente reticulado en los márgenes (Sauer, 1967; Costea *et al.*, 2003; Das, 2016).

Distribución: Esta especie habita zonas arvenses y ruderales, se distribuye en el valle de México a una altitud de 3,000 m, en diferentes condiciones ambientales, pero está más representada a una altitud de 2,500 m (Figura 2). Actualmente, se distribuye como una maleza de campos agrícolas y otros hábitats alterados, y se encuentra entre las 18 malezas más nocivas del mundo (Das, 2016).

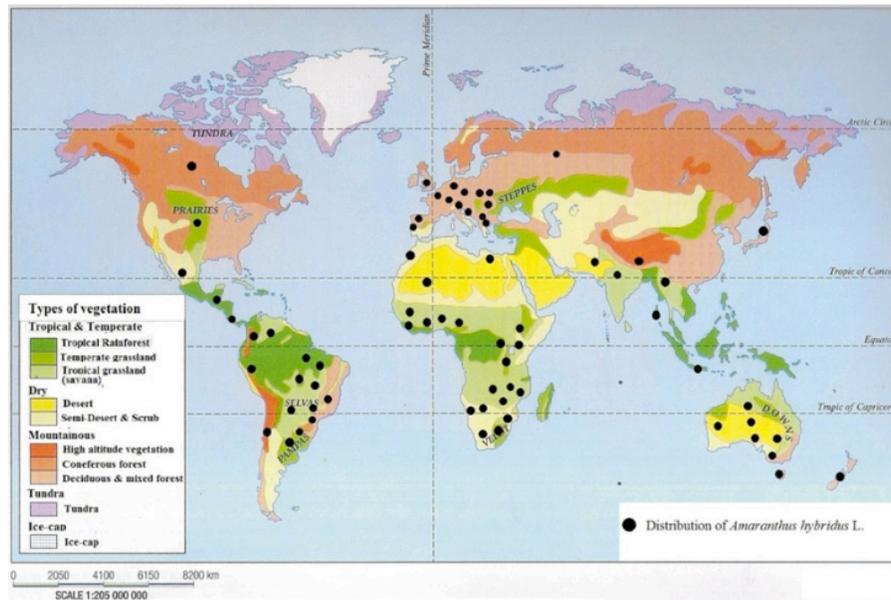


Figura 2. Distribución de *Amaranthus hybridus* L alrededor del mundo (Das, 2016).

Centro de domesticación: *Amaranthus hybridus* es el progenitor silvestre de los amarantos de grano (*A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*). Estudios filogenéticos y genómicos han confirmado su estrecha relación genética con las especies domesticadas, evidenciando un proceso de selección y adaptación desde poblaciones silvestres (Das, 2016; Stetter *et al.*, 2019).

Historia: *Amaranthus hybridus* se originó como una especie pionera de la ribera del este de América del norte, con una distribución previa que se expandió por regiones más fértiles y húmedas de México, América central y el norte de América del sur. El registro más antiguo de la especie en Europa se remonta a aproximadamente 300 años. La propagación de *A. hybridus* en Europa se produjo principalmente en la región mediterránea, de manera lenta en comparación con otras especies de amaranto. También, se tiene registro de esta especie en el oeste de América del norte, Asia oriental, Australia y Sudáfrica (Das, 2016).

Nombre común: A esta especie se le puede encontrar bajo el nombre común de “Quelite” o “Quintonil” y se ha considerado una planta comestible que se encuentra como arvense o ruderal (Salazar-Zaragoza, 1998).

Características morfológicas: *Amaranthus hybridus* es una hierba erecta de hasta dos metros de altura, glabra o pubescente, con tallos estriados, algunas veces estos suelen ser de color rojizo y con frecuencia muy ramificadas. Las hojas son de forma lanceolada a ovada-

rómbica de tres centímetros de largo por 1-7 cm de ancho, a veces teñidas de rojo, prominentemente venosas. La inflorescencia terminal erguida en espigas paniculadas, y con semillas de 1 mm de diámetro de color café-rojizo o negro brillante.

1.6. *Amaranthus palmeri* S. Watson

Acerca del cultivo y usos: *Amaranthus palmeri* es una hierba dioica que se ha convertido en una especie invasora por su capacidad de adaptación y alta resistencia a herbicidas. Es considerada una de las especies más problemáticas para el sector agrícola. Esta especie se ha documentado por primera vez en la Península de Yucatán para tomar precauciones en esta región de alta biodiversidad. La especie es una hierba anual nativa de América del norte, ha tenido una gran relación con el ser humano en los aspectos alimenticios por haber sido utilizada como alimento (verdura o como grano) por diferentes tribus y civilizaciones. En los últimos años, ha cobrado una gran importancia, puesto que afecta la productividad en los campos agrícolas (Sánchez-del Pino *et al.*, 2019).

Acerca del grano y semilla: Las semillas de *A. palmeri* son redondas a ligeramente obovadas, lenticulares, de color pardo rojizo oscuro, brillantes, 0.7-1.4 mm diámetro (Sánchez-del Pino *et al.* 2019).

Distribución: *Amaranthus palmeri* está ampliamente distribuido en México, con registros en más de 20 estados, incluyendo Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Nuevo León y Veracruz. Se desarrolla en diversos ecosistemas, desde selva baja caducifolia hasta bosques de *Quercus*, adaptándose a suelos arenosos, fluvisoles y terrenos perturbados entre 0 y 2,092 msnm (Espitia *et al.*, 2010; Sánchez-del Pino *et al.*, 2019). La distribución de esta especie se ha documentado por el transporte de semillas o el incremento de zonas agrícolas que permitieron su expansión territorial, porque, a pesar de ser una especie dioica, tiene ventajas que favorecen su desarrollo y proliferación en ambientes artificiales, con una gran capacidad adaptativa en ambientes hostiles y con resistencia a herbicidas (Figura 3) (Sánchez-del Pino *et al.*, 2019).

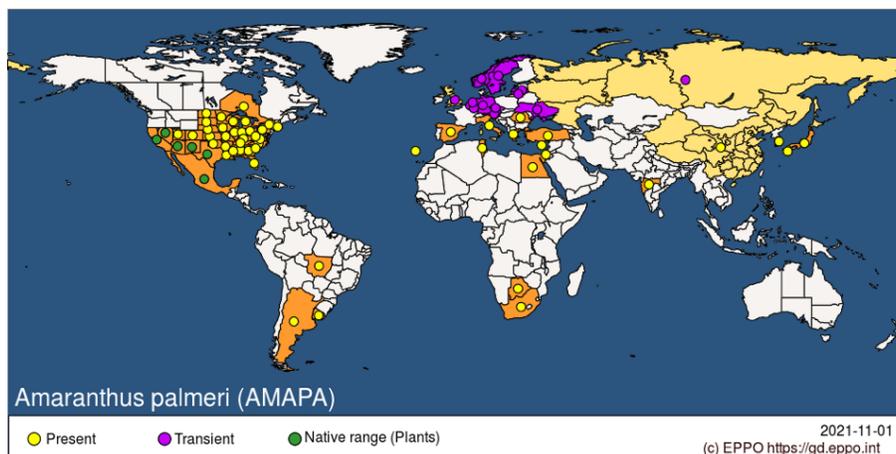


Figura 3. Distribución de *Amaranthus palmeri* L. alrededor del mundo (EPPO Global Data Base).

Centro de domesticación: Sin datos. Es considerado una hierba sin valor comercial e invasora.

Nombre común: Alegría, bledo, bledo blanco, quelite, quintonil espinoso y quintonil (Sánchez-del Pino *et al.*, 2019).

Características morfológicas: La morfología reportada para esta especie destaca como una planta herbácea, anual, dioica, de hasta 160 cm de altura, con tallos erectos, ramificados, glabros, de coloración verde a rojiza. Sus hojas son entre 1.5-7.2 × 0.7-3.3 cm con estructura laminar plana, oblanceoladas, lanceoladas a elípticas. Inflorescencias terminales, tipo espiga o panícula, erectas, hasta 40.1 cm de largo y 1.5 cm de ancho, con flores pistiladas de 2.3-4.3 mm de largo, y bráctea 2.3-4.5 × 0.6-1.4 mm, nervadura central largamente decurrente y engrosada (Sánchez-del Pino *et al.*, 2019).

1.7. *Amaranthus cruentus* L.

Acerca del cultivo y usos: *Amaranthus cruentus* es una de las especies que junto con *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, son productoras de granos y son consideradas pseudocereales, con semillas con alta concentración de proteínas y ricas en el aminoácido lisina (Sunil *et al.*, 2014). Se adapta de manera favorable a diversos ecosistemas y climas gracias a su metabolismo por la ruta de fijación del carbono C₄, resaltando la tolerancia al estrés hídrico (Sunil *et al.*, 2014; Espitia-Rangel, 2010). Las semillas se emplean en la producción de harinas, cereales y productos derivados. Sus hojas y tallos jóvenes son consumidos como verdura por su alto

contenido de minerales y antioxidantes. En la industria cosmética y farmacéutica, se ha utilizado debido por su contenido de escualeno, flavonoides y polifenoles (Bressani *et al.*, 2009; Achigan-Dako *et al.*, 2014).

Las hojas y semillas de *A. cruentus* han sido utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas. Extractos de la planta han demostrado actividad hepatoprotectora, hipoglucemiante y antihipertensiva, lo cual es atribuido a la presencia de polifenoles, betalaínas y compuestos fenólicos. Además, su consumo se ha asociado con la reducción del estrés oxidativo y la mejora de la función inmune (Paško *et al.*, 2009; Gorinstein *et al.*, 2007).

Acerca del grano y semilla: Los granos de *A. cruentus* suelen ser de semilla blanca, los cuales, se usan como pseudocereales y los granos de semilla marrón o negra son para verdura. Las semillas de *A. cruentus* son lenticulares a elíptico-lenticulares, con variabilidad cromática que incluye blanco o marfil con tonalidades rojizas o amarillentas, y ocasionalmente marrón oscuro a marrón rojizo oscuro. Presentan un diámetro de 1.2-1.6 mm, con superficie lisa o indistintamente punteada (Das, 2016).

Distribución: Entre las especies de *Amaranthus*, *A. cruentus* es probablemente la más adaptable y se cultiva tradicionalmente como pseudocereal en países latinoamericanos como México, Guatemala, Ecuador y Colombia. También se cultiva con fines comerciales en regiones secas y cálidas de Estados Unidos, Argentina y China (Figura 4) (Das, 2016). *A. cruentus* en su forma de hortaliza probablemente fue introducido en los trópicos y subtrópicos del Viejo Mundo durante el periodo colonial. Actualmente, es un vegetal ampliamente cultivado en África tropical, siendo el principal en Benín, Togo y Sierra Leona, y de gran importancia en regiones de baja altitud como el sur de Nigeria, República Democrática del Congo, Kenia y Tanzania. Su cultivo es más frecuente en zonas húmedas de tierras bajas que en áreas altas o áridas. También es un vegetal de relevancia en países tropicales fuera de África, como India, Bangladesh, Sri Lanka y el Caribe (Achigan-Dako *et al.*, 2014; Das, 2016).

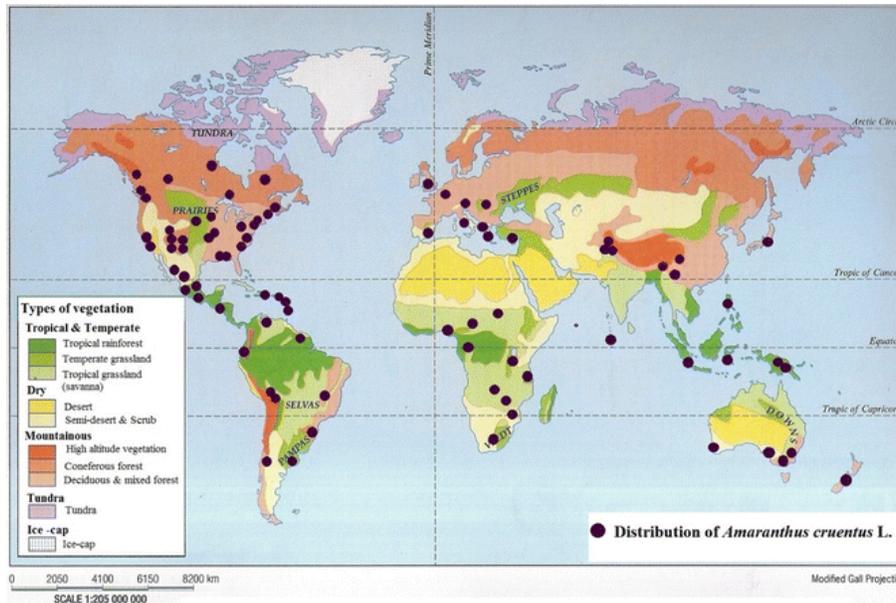


Figura 4. Distribución mundial de *Amaranthus cruentus* L. (Das, 2016).

Centro de domesticación: La especie *Amaranthus cruentus* L. fue domesticada en Centroamérica, lo que fue Mesoamérica como parte de México y Guatemala en la actualidad. Se tiene registro que la domesticación de esta especie fue mucho antes que *A. hypochondriacus* (Das, 216; Stetter *et al.*, 2019).

Historia: Los datos arqueobotánicos datan a esta especie desde 5500 A.C., por el fósil encontrado en las cuevas de Tehuacán, Puebla, en el centro de México. En Guatemala y México, existen culturas indígenas que aún conservan el germoplasma de *A. cruentus* tanto para fines comerciales como ornamentales (Das, 2016; Sauer, 1969).

Nombre común: *Amaranthus cruentus* es también conocido como amaranto de sangre o rojo, amaranto morado y amaranto oruga (Das, 2016).

Características morfológicas: *Amaranthus cruentus* es una hierba anual que crece erguida y casi sin vellosidades, aunque ligeramente pubescente en la parte más distal, especialmente durante su juventud, alcanzando una altura máxima de 2.0 m, siendo más pequeño en comparación con *A. hypochondriacus*. Sus tallos son erguidos y ramificados en la parte superior, principalmente en las inflorescencias, llegando casi a ser simples, y pueden presentar un color verde o púrpura rojizo. Sus hojas son pecioladas, con un pecíolo que es aproximadamente la mitad de largo que la lámina y de forma rómbica-ovada u ovada a lanceolada

amplia, con dimensiones que pueden variar entre 3-14 cm de longitud y 1.5-8 cm de ancho; en plantas robustas, pueden ser más grandes. Las hojas tienen una base que va de cuneada a ampliamente cuneada, son enteras y pueden presentar un ápice que va de agudo a acuminado, o de obtuso a ligeramente emarginado (Das, 2016).

Las inflorescencias de *Amaranthus cruentus* son terminales y axilares, creciendo erguidas, y generalmente presentan un color rojo oscuro, aunque ocasionalmente pueden ser de color púrpura, verdes o rojo verdoso. Las inflorescencias, al menos en la parte distal, carecen de hojas y son enormes y robustas, con las inferiores formando espigas laxas y suaves, y las superiores formando panículas. Las brácteas son espatuladas y miden entre 2 y 3 mm de largo, iguales o ligeramente más largas que los tépalos, con un ápice espinoso corto y nervios que alcanzan la misma longitud que las ramas del estilo. Las flores pistiladas tienen cinco tépalos que son rectos, oblongos a oblongo-obovados o lanceolados, sin espinas, y son iguales o casi iguales en longitud, con los tépalos internos siendo ligeramente más cortos que los externos, y miden entre 1.5 y 3 mm de largo, con un ápice agudo. El estilo de las flores pistiladas tiene ramas delgadas y erectas, con estigmas en número de tres. Las flores estaminadas se encuentran en las puntas de las inflorescencias, presentando cinco tépalos y cinco estambres. Los frutos son obovoides a alargados-obovoides, con un utrículo circunscisil que se estrecha en una torre en el ápice, midiendo entre 2 y 2.5 mm de largo, lisos o ligeramente rugosos en la parte distal, y dehiscentes de manera regular. Las semillas son ampliamente lenticulares a elípticas-lenticulares, presentando una variedad de colores que van desde el blanco o marfil con tonos rojizos o amarillentos, hasta ocasionalmente un color marrón oscuro a marrón rojizo oscuro, con un diámetro que oscila entre 1.2 y 1.6 mm, y una superficie lisa o ligeramente punteada (Das, 2016).

1.8. Metabolitos secundarios presentes en la familia Amaranthaceae

El análisis quimiométrico del amaranto ha documentado la presencia de una vasta gama de metabolitos secundarios. A pesar de que estos componentes no sean esenciales para el metabolismo fotosintético o respiratorio, tienen diferentes funciones para la supervivencia de la planta en el medio ambiente de diferentes maneras, como compuestos de señal y defensa o para protección frente a la radiación ultravioleta y los oxidantes del ambiente, lo que lleva a una mejor adaptabilidad de la especie (Niveyro *et al.*, 2013).

La información acerca de los metabolitos secundarios en la familia Amaranthaceae es limitada. Algunos de los metabolitos secundarios que se destacan en la familia Amaranthaceae son los flavonoides y compuestos fenólicos o polifenólicos, los cuales generalmente se han aislado de las hojas. La mayoría de dichos compuestos ha mostrado tener beneficios para la salud humana debido a sus características, principalmente antioxidantes y nutricionales. Algunas investigaciones utilizando espectrometría de masas han reportado la presencia de algunos flavonoides como rutina y quercetina, así como ácido gálico en especies de *Amaranthus cruentus* (Coelho *et al.*, 2022; Nana *et al.*, 2012). Por otra parte, algunas otras especies como *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus* se han aislado glucósidos de kaempferol, algunos hidroxicinamatos y hidroxicinnamil amidas que se presentan en la Tabla 1 (Steffensen *et al.* 2011). Sin embargo, no sólo las propiedades antioxidantes y nutricionales son interesantes en esta familia sino también por su papel en la interacción entre las plantas, los organismos herbívoros y los patógenos. Se ha documentado que los grupos ácidos y fenólicos de la familia de compuestos presentan efectos negativos sobre los insectos, actuando como disuasivos o incluso presentan una toxicidad frente a insectos no adaptados, generando una mayor tasa de supervivencia de la familia de plantas. Sin embargo, en *Amaranthus* se sabe poco sobre los mecanismos de defensa, ya sean constitutivos o inducibles, que las plantas podrían emplear para reducir el daño por insectos (Niveyro *et al.*, 2013).

Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en la familia Amaranthaceae empleando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (Steffensen *et al.*, 2011).

Metabolito secundario	Tipo	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	Modo
Rutina	Flavonoide	609.5 [M-1]	300.7	Negativo
Isoquercitrina	Flavonoide	463.3 [M-1]	300.4	Negativo
Nicotiflorina	Flavonoide	593.5 [M-1]	284.9	Negativo
Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido hidroxibenzoico	137.2 [M-1]	92.8	Negativo
Ácido salicílico	Ácido hidroxibenzoico	137.2 [M-1]	92.8	Negativo
Ácido protocatéquico	Ácido hidroxibenzoico	153.1 [M-1]	109.0	Negativo
Ácido vanílico	Ácido hidroxibenzoico	167.2 [M-1]	152.0	Negativo
Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido hidroxicianámico	163.2 [M-1]	119.2	Negativo
Ácido cafeico	Ácido hidroxicinámico	179.0 [M-1]	135.0	Negativo
Ácido ferúlico	Ácido hidroxicinámico	193.0 [M-1]	149.0	Negativo
<i>N-trans</i> -Caffeoil tiramina	Hidroxicinamil amida	298.0 [M-1]	135.2	Negativo
<i>N-trans</i> -Feruloil tiramina	Hidroxicinamil amida	312.1 [M-1]	148.0	Negativo
<i>N-trans</i> -Feruloil-4- <i>O</i> - metildopamina	Hidroxicinamil amida	342.2 [M-1]	190.1	Negativo
Glicinbetaína	Betaína	118.5 [M+1]	58.3	Positivo
Trigonelina	Betaína	138.2 [M+1]	92.1	Positivo

Otro grupo de compuestos de interés científico y económico en las especies de amaranto son las betalainas, las cuales son pigmentos que varían en las tonalidades de rojo, violeta y amarillo, y son exclusivas de plantas del orden Caryophyllales (Polturak y Aharoni, 2018). Las betalainas derivan de la tirosina y se caracterizan por ser pigmentos nitrogenados y solubles en agua. Además de tener un interesante espectro de propiedades como pigmentos, también presentan una fuerte actividad antioxidante (Escribano *et al.*, 1998; Kanner *et al.*, 2001).

En función de sus características estructurales y propiedades de absorción de la luz, las betalainas se clasifican generalmente en dos grupos (Polturak y Aharoni, 2018):

1. Betacianinas (rojo-violeta)
2. Betaxantinas (amarillas)

Las betacianinas se pueden a su vez dividir en subgrupos que incluyen pigmentos de tipo betanina, gomfrenina, amarantina y buganvilina (Figura 5). Todas las betalaínas se basan en un andamio estructural común, el ácido betalámico, que se condensa con derivados del ciclo-DOPA, o con varios aminoácidos y otras aminas, para formar betacianinas o betaxantinas, respectivamente. Las diferencias estructurales obtenidas tras la condensación del ácido betalámico con varios compuestos determina la absorción aparente de los dos subgrupos de betalaínas. Las betacianinas muestran un máximo de absorción entre los 535-538 nm, mientras que las betaxantinas suelen mostrar la mayor absorción en el rango de 460-480 nm, según la estructura molecular y el tipo de disolvente (Stintzing y Carle, 2007; Khan y Giridhar, 2015).

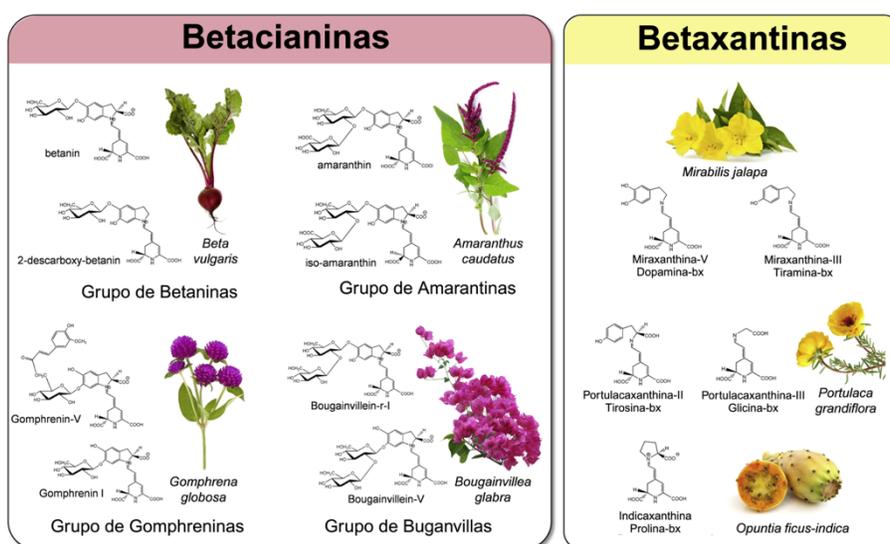


Figura 5. Estructuras representativas de betalaínas (Polturak & Aharoni, 2018).

1.9. Metabolómica y estudios relacionados con el amaranto

El metabolismo juega un papel central en todas las áreas de la biología, desde la ecología hasta la bioingeniería y en salud, por ejemplo, enfocada en la búsqueda para combatir el cáncer. Cada una de estas áreas del conocimiento ahora tienen la posibilidad de examinar el metaboloma, gracias a los esfuerzos y avances en las áreas de la cromatografía, la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. La metabolómica es una disciplina hermana de las otras disciplinas llamadas “ómicas” como la genómica, transcriptómica y proteómica (Figura 6), la cual se ha definido como el estudio sistemático de las pequeñas moléculas de naturaleza orgánica (metabolitos) presentes en un sistema biológico, y su análisis tiene como principal

objetivo evaluar de forma cualitativa y cuantitativa todos los metabolitos en un organismo (Hernández Galicia, 2014).

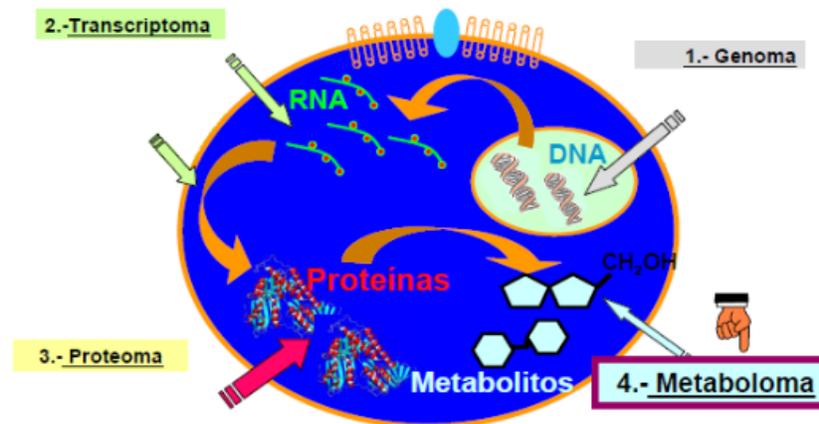


Figura 6. Integración de las disciplinas “ómicas” en una célula (Hernández Galicia, 2014).

En el caso de la metabolómica, los datos se generan por medio de tres líneas de investigación ya bien definidas y conocidas (Hernández-Galicia, 2014; Heinrich, 2005):

- Técnicas cromatográficas.
- Espectrometría de masas, no dirigida y dirigida.
- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (1D o 2D).

Lo más importante y medular, es que en el uso de la metabolómica puede no ser imprescindible aislar metabolitos puros cuando se emplea validación por fragmentación molecular y bases de datos, y con la ayuda de herramientas estadísticas multivariadas que permite obtener un análisis robusto, preciso y con gran exactitud y veracidad en los resultados. Lo cual, ofrece un avance tecnológico para comprender los sistemas biológicos (Heinrich, 2005).

De acuerdo con Jang *et al.* (2018) la metabolómica implica tres pasos básicos (Figura 7):

1. Preparación de la muestra.
2. Medición del metaboloma.
3. Análisis de datos.

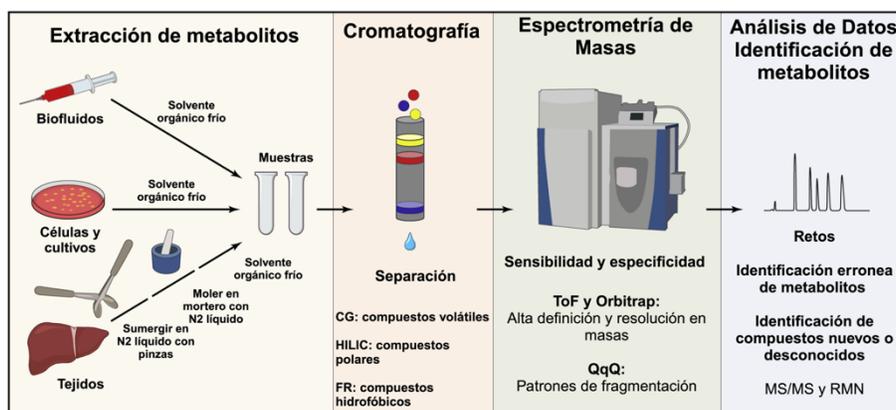


Figura 7. Pasos indispensables en el análisis metabolómico (Jang *et al.*, 2018).

La cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés) permite tener la solución a uno de los desafíos más importantes en la metabolómica que es elucidar los metabolitos presentes en un extracto. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) por el contrario es menos sensible que LC-MS y aporta un perfil de señales que podrían asignarse a ciertos grupos funcionales de algunas moléculas dentro del extracto, aportando una mayor información sobre la estructura. La LC-MS permite validar la anotación de metabolitos ya que se puede separar un conjunto de moléculas presentes en un extracto e ir analizando por el patrón de fragmentación para darle una identidad a cada señal, esto es debido a su capacidad incomparable para detectar metabolitos de baja abundancia sin la interferencia de especies químicas estrechamente relacionadas o inclusive llegando a resolver epímeros o hasta compuestos isobáricos con estructuras químicas similares, como se muestra en la Figura 8 (Jang *et al.*, 2018).

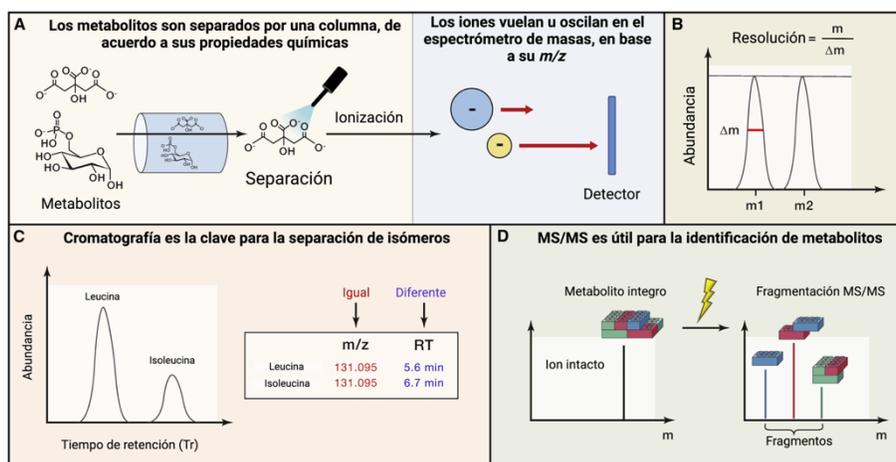


Figura 8. (A) Separación por LC para ingresar al proceso de ionización en MS, (B) Resolución en MS para distinguir metabolitos similares, (C) LC permite la separación de isómeros o moléculas con similitud de afinidad o estructuras químicas parecidas, (D) Experimentos de MS/MS permiten aumentar la selectividad del análisis (Jang *et al.*, 2018).

En la literatura se encuentran reportados algunos trabajos que abordan el estudio del amaranto desde una perspectiva metabolómica (e.g. Palmeros-Suárez *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2018; Rocchetti *et al.*, 2020; Manyelo *et al.*, 2022). El trabajo de Rocchetti *et al.* (2020) describe al amaranto entre las variedades más populares de microvegetales por sus propiedades nutrimentales, así como por el contenido de betalaínas y polifenoles, responsables del su coloración y potencial antioxidante. Los resultados que los autores reportaron fue la presencia de 316 compuestos, principalmente polifenoles y lípidos, utilizando metabolómica no dirigida por HPLC-MS con un detector de cuadrupolo con tiempo de vuelo (Q-ToF).

Un segundo estudio reportado por Guo *et al.* (2018) tuvo como objetivo investigar la respuesta metabólica de plántulas de amaranto comestibles bajo condiciones de estrés salino, y documentó principalmente los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la respuesta ante este tipo de estrés. En general, este estudio aborda una perspectiva metabolómica totalmente dirigida a determinar y conocer los metabolitos del ciclo de Krebs y cómo varían su concentración en respuesta al estrés. El estudio concluye que la salinidad cambió significativamente los perfiles metabólicos en la raíz, los exudados de la raíz y el suelo de la rizósfera de los cultivares de amaranto. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos fue regulado al alza en la raíz, aumentó directamente la liberación de ácido málico y ácido fumárico e indirectamente la liberación de ácido aspártico y ácido glutámico posiblemente a través de su precursor, lo que resultó en la acidificación de la rizósfera.

Guo *et al.* (2018) caracterizaron un total de cinco vías metabólicas, incluidas la síntesis de alanina; el aspartato y glutamato; glicina; serina y treonina; además el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato; metabolismo del ciclo del ácido tricarboxílico; y metabolismo de arginina y prolina, demostrando que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos es regulado positivamente por el tratamiento de estrés salino en los cultivares de amaranto (Figura 9).

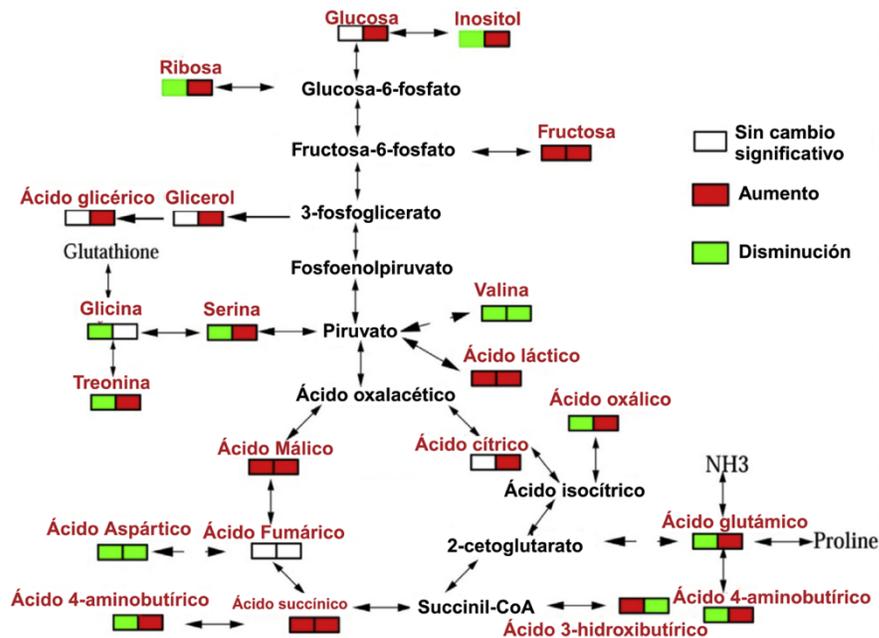


Figura 9. Visualización comparativa de los niveles de metabolitos (Guo *et al.*, 2018).

En un tercer estudio realizado por Nkobile y Prinsloo (2021), los autores utilizaron RMN y LC-MS para el análisis y comparación metabolómica entre especies silvestres y cultivadas de *A. cruentus* y *A. hybridus*, donde investigaron el efecto del cultivo y el medio ambiente en el perfil químico. Sin embargo, sus resultados fueron dirigidos en su mayoría hacia metabolitos primarios como glucosa, maltosa, diferentes aminoácidos y proteínas. Sólo algunos metabolitos secundarios como la rutina, kaempferol y quercetina fueron incluidos. El estudio determinó que la maltosa y la sacarosa aumentaron tanto para *A. cruentus* y *A. hybridus*, además que los aminoácidos prolina y leucina fueron superiores en *A. hybridus*, cuando se exponen a condiciones estresantes, teniendo una correlación positiva entre la acumulación de prolina y el estrés de los amarantos. Los metabolitos secundarios encontrados fueron principalmente los flavonoides, destacando el kaempferol, el cual es un polifenol antioxidante que aumenta su concentración en la planta cuando se somete a condiciones de estrés.

Manyelo *et al.* (2022) investigaron el impacto en la composición química y la variación metabólica de la cosecha de granos en una fase temprana de la maduración versus granos maduros de *A. cruentus* cultivados en Sudáfrica. En ese estudio, se determinó que la concentración de α -tocoferol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol y δ -tocotrienol es mayor en los granos maduros en comparación con los granos cosechados prematuramente. En el análisis de los metabolitos secundarios (rutina, quercetina, kaempferol, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico) se observó un incremento drástico en la concentración de dichos metabolitos en los granos maduros en comparación con los prematuros, aunque la composición de aminoácidos no se vio afectada por la madurez de la cosecha, concluyendo que el grano cosechado maduro es de calidad nutricional sobresaliente

Los cuatro estudios mencionados son los únicos que abordan una perspectiva metabólica en amaranto. Por otra parte, en la literatura se han reportado trabajos que presentan cuantificaciones de metabolitos (metabólica dirigida), generalmente la mayoría se centra en los polifenoles y betalaínas. Actualmente, no se encuentra reportado en la literatura un trabajo integral en amaranto que explore el metaboloma completo en diferentes estadios del crecimiento de la planta y tampoco un estudio comparativo del metaboloma entre especies del género *Amaranthus*.

1.10. Efectos farmacológicos reportados para metabolitos presentes en amaranto

El amaranto es una fuente de metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos, betalaínas y compuestos de naturaleza terpenoide, los cuales han demostrado tener beneficios a la salud y han dado lugar a diferentes estudios en la última década. Se ha demostrado que diferentes metabolitos secundarios poseen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y de promoción a la salud, por estudios *in vivo* en modelos de murinos y en estudios *in vitro*. También se documentó que dichos metabolitos juegan un papel importante en la salud intestinal, evaluando su eficacia en cultivos de células Caco-2 del epitelio del colon, y en la prevención de la inflamación inducida por obesidad en ratones, demostrando una mejoría ante procesos inflamatorios generados por obesidad inducida (Tang y Tsao, 2017).

Muchos nutrientes no esenciales, como los compuestos fenólicos y los carotenoides, tienen diversas actividades beneficiosas para la salud, incluidas propiedades antioxidantes, antivirales y antiinflamatorias (Dziki *et al.*, 2014). El estrés oxidativo, resultante del desequilibrio

entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la defensa antioxidante puede provocar daño oxidativo (Figura 10).

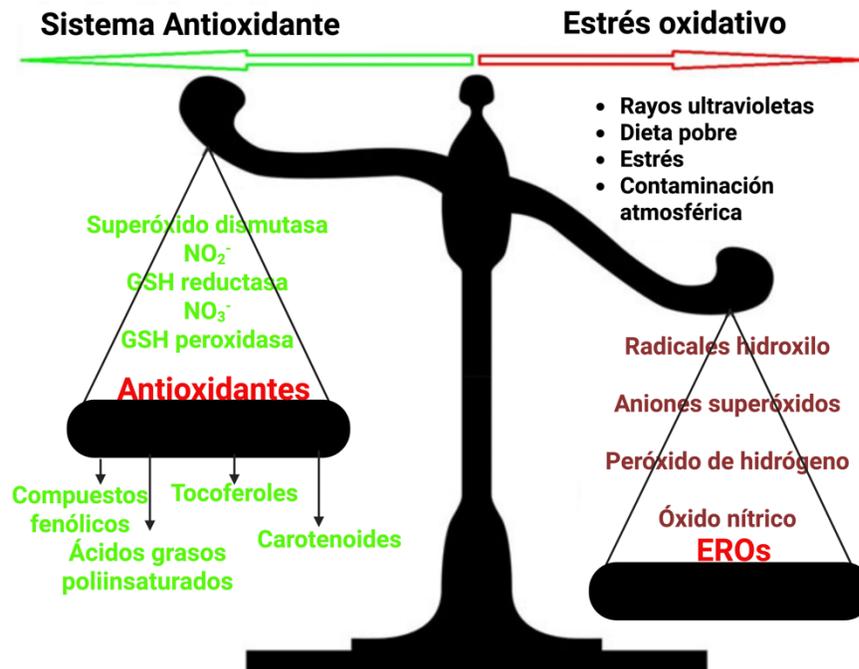


Figura 10. Los metabolitos secundarios del amaranto pueden ayudar a restablecer el equilibrio entre el estrés oxidativo y la defensa antioxidante (Tang & Tsao, 2017).

Las semillas de amaranto son una excelente fuente de antioxidantes. Las actividades antioxidantes, medidas por diferentes ensayos, han demostrado que el contenido total de polifenoles está correlacionado con dicha actividad. De manera similar, existen antioxidantes lipofílicos tales como los tocoferoles, derivados de la vitamina E y carotenoides que contribuyen significativamente para reducir las ROS (Tang & Tsao, 2017).

Se ha reportado que estos mismos metabolitos de naturaleza polifenólica pueden ser reguladores y mediadores de los procesos inflamatorios en el organismo, regulando negativamente las citocinas IL-1- β , IL-8 y TFN, lo cual previene la inflamación inducida por la obesidad (Noratto *et al.*, 2015). Los compuestos bioactivos del amaranto como los flavonoides y las betalaínas han demostrado promover la expresión de la IL-10, una citocina de carácter antiinflamatoria, y disminuir la acumulación de citocinas y factores de transcripción ligados a los procesos inflamatorios, como se ilustra en la Figura 11.

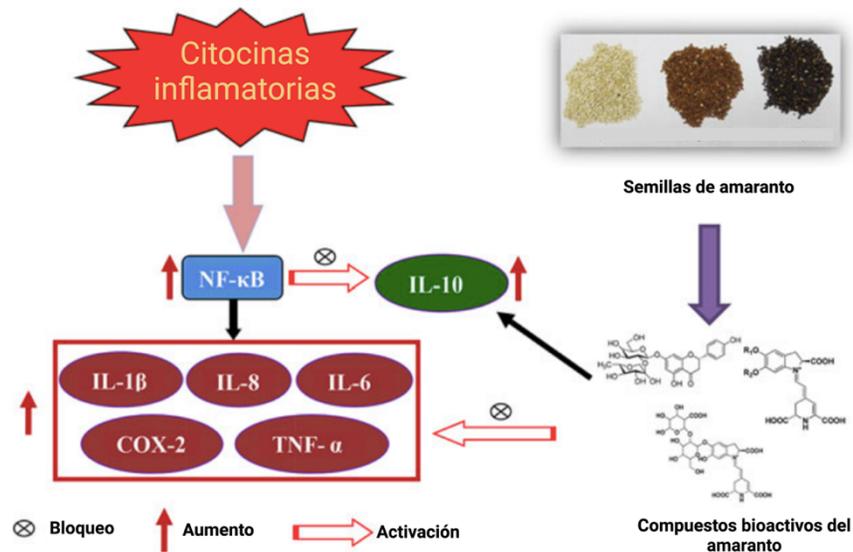


Figura 11. Efectos antiinflamatorios de los metabolitos secundarios en el amaranto (Tang y Tsao, 2017).

Otras de las actividades farmacológicas en los metabolitos secundarios presentes en la familia Amaranthaceae se relacionan con el tratamiento de obesidad y la diabetes. La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasas que puede ser perjudicial para la salud; de acuerdo con la OMS, para que una persona sea considerada con sobrepeso debe tener un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o por encima de 25 y con obesidad igual o superior a 30. La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia lo que se traduce en el aumento de glucosa en la sangre, generando un trastorno metabólico drástico en el organismo (OMS, 2019).

Las enzimas glucosidasas y las lipasas pancreáticas son enzimas importantes para la digestión de carbohidratos complejos y la absorción de lípidos después de descomponer triglicéridos. La inhibición de estas dos enzimas por los alimentos bioactivos sugiere beneficios potenciales en el control de la glucosa en sangre y el peso. Los compuestos fenólicos han demostrado tener una fuerte actividad inhibitoria para dichas enzimas (Tang *et al.*, 2016). Las semillas del amaranto pueden actuar como un agente protector moderado contra la obesidad inducida por la fructuosa y la diabetes (Pasko *et al.*, 2011). El grano de amaranto y su fracción de aceite disminuyeron significativamente la glucosa en suero y aumentaron el nivel de insulina en suero de ratas diabéticas, por tanto, las semillas de amaranto ofrecen beneficios para corregir

la hiperglucemia, sin embargo, los componentes químicos de los extractos del amaranto no se han identificado claramente, por lo cual existe una laguna en dicho segmento de la investigación que plantea abordarse en el presente trabajo.

Los antecedentes presentados en este capítulo permiten establecer que el género *Amaranthus* ha sido históricamente subvalorado, en específico, en términos de su aprovechamiento farmacológico, a pesar de su reconocida importancia nutricional y cultural. Dentro del género, *Amaranthus cruentus* es una especie que sobresale por sus intensas coloraciones rojo-violeta tanto en sus inflorescencias como en sus hojas, cuya elucidación química no ha sido completamente caracterizada. Aunque se ha documentado la presencia de betalaínas como pigmentos principales en algunas especies del género, la distribución específica, abundancia y función biológica de estos compuestos en hojas e inflorescencias de *A. cruentus* siguen siendo poco explorada y reportada en la literatura. Adicionalmente, las betalaínas y los polifenoles, no sólo cumplen funciones ecológicas, sino que también poseen un creciente interés farmacológico por sus propiedades antioxidantes, antihipertensivas y antidiabéticas. Esta combinación de vacíos de conocimiento en la literatura y su potencial farmacológico, justifica debidamente la necesidad de estudiar el metaboloma de *A. cruentus*, así como su correlación con actividades farmacológicas en modelos experimentales de enfermedades metabólicas.

JUSTIFICACIÓN

El amaranto ha sido un alimento cultivado desde tiempos prehispánicos, destacándose por su alto valor nutricional, principalmente en su composición de proteínas con altos niveles en lisina, y minerales, en comparación con cultivos como el maíz y el sorgo. Además, existe evidencia que el centro de domesticación de dos de tres especies llamadas “de grano de *Amaranthus*” fue en Mesoamérica, y tenía gran importancia en la cosmovisión del imperio azteca. Actualmente, *Amaranthus hypochondriacus* es la especie con mayor impacto comercial en México, debido a su alta producción de grano, que se utiliza de manera artesanal para fabricar “alegrías”, que son dulces típicos, y las hojas del amaranto que son utilizadas como “quelites” en diferentes platillos gastronómicos.

De las especies de amaranto con mayor impacto comercial, principalmente por su producción de grano a nivel mundial, son *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus*, este último, tiene escasa atención científica, en donde la investigación se ha centrado principalmente en sus propiedades nutricionales. Sin embargo, *A. cruentus* es una de las especies más fascinantes en cuanto a tonalidades de sus inflorescencias y hojas, presenta coloraciones desde tonalidades naranjas, rojas y moradas, y hasta la fecha se conoce poco sobre la naturaleza fitoquímica que dé lugar a estos fenotipos y la variación metabólica entre los mismos.

Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo principal, comprender el metaboloma de una accesión de amaranto rojo (*A. cruentus*), tanto en hojas e inflorescencias, las cuales son de gran interés debido a sus efectos potencialmente benéficos en la salud en procesos como la inflamación, diabetes, hipertensión, obesidad y estrés oxidativo celular. Finalmente, entender el metaboloma de esta accesión y su relación con sus propiedades farmacológicas permitirá elucidar esta relación metaboloma/farmacodinámica, contribuyendo así a su potencial uso terapéutico y promoviendo su valor como súper alimento.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles son los grupos de fitoquímicos que se encargan de dar la coloración roja en *A. cruentus*?
2. ¿Son los extractos orgánicos de *A. cruentus* potencialmente activos frente a modelos farmacológicos antidiabéticos y antihipertensivos?
3. Si presentan actividad biológica en modelos de diabetes e hipertensión, ¿Cuáles son los grupos de fitoquímicos que pudieran estar relacionados con el potencial antidiabético y antihipertensivo?
4. ¿Cuál sería la aproximación farmacodinámica al efecto farmacológico de los extractos activos de *Amaranthus cruentus*?

HIPÓTESIS

Con base en la literatura, se ha reportado que la coloración roja de *Amaranthus cruentus* podría estar asociada a una elevada concentración de betalaínas y compuestos fenólicos, metabolitos con reconocida actividad antioxidante. Las betalaínas y los polifenoles presentes en el género *Amaranthus*, podrían contribuir a efectos farmacológicos en modelos de diabetes e hipertensión. Por tanto, la caracterización cualitativa y cuantitativa del metaboloma de *A. cruentus* permitirá identificar fitoquímicos con estructuras químicas privilegiadas que fundamenten dichas actividades farmacológicas (antihipertensivas y antidiabéticas) en estudio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el metaboloma de las inflorescencias y hojas de *Amaranthus cruentus* y analizar su posible relación con la actividad antihipertensiva y antidiabética.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer, optimizar y validar las condiciones cromatográficas y espectrométricas para determinar el perfil metabolómico en hojas e inflorescencias de amaranto.

2. Desarrollar, optimizar y validar las condiciones de extracción para los diferentes metabolitos presentes en las hojas e inflorescencias de amaranto.
3. Determinar el metaboloma de *Amaranthus cruentus* (amaranto rojo).
4. Evaluación de la actividad farmacológica en modelos de diabetes e hipertensión de los extractos de amaranto rojo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La primera fase de la estrategia experimental fue obtener el tejido vegetal, la cual estuvo a cargo del Dr. Andrés Xingú López, postdoctorante en el grupo del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, el cual se cultivó en sustrato y ambiente controlados en invernaderos y en cielo abierto. Las hojas e inflorescencias colectadas en los invernaderos del CICY se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su análisis. Las metodologías para la obtención de los extractos orgánicos, determinación del metaboloma y efectos farmacológicos y la aproximación farmacodinámica se encuentran descritas en los capítulos II, III y IV de la presente tesis. En la Figura 12 se presenta la estrategia experimental general para responder nuestras preguntas de investigación:

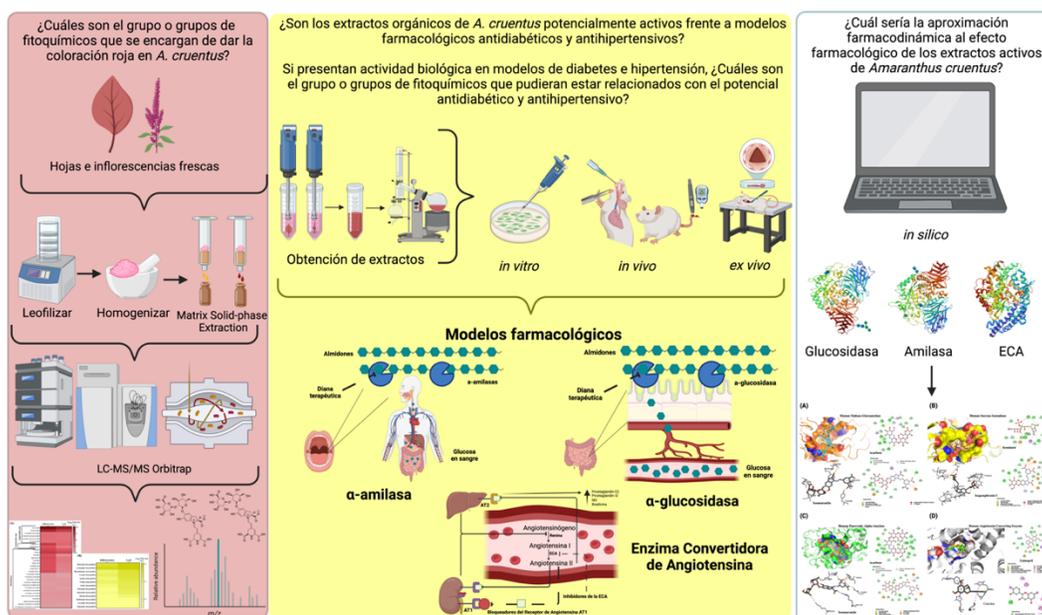


Figura 12. Estrategia experimental implementada en la presente tesis para la determinación del metaboloma, efecto *in vitro* e *in vivo* en un modelo farmacológico antidiabético, vasorelajante y aproximación farmacodinámica *in silico*

BREVE RESUMEN DE LOS CAPÍTULOS

Esta sección contiene un resumen de los capítulos incluidos en esta tesis, organizados y asociados de acuerdo con los objetivos específicos:

El capítulo II se centró en un grupo del metaboloma, las betalaínas, compuestos de gran interés biotecnológico por ser pigmentos naturales, que, hasta la fecha, son poco exploradas. En la literatura, la información es poca y difusa, por ello, este capítulo tiene el objetivo de establecer el proceso global analítico para identificar al grupo de las betalaínas (betacianinas y betaxantinas).

El capítulo II se asocia a los objetivos específicos: 1) establecer, optimizar y validar las condiciones cromatográficas y espectrométricas para determinar el perfil metabolómico en hojas e inflorescencias, y 2) desarrollar, optimizar y validar las condiciones de extracción para los diferentes metabolitos presentes en las hojas e inflorescencias. El capítulo II detalla el método cromatográfico y espectrométrico para el análisis de betalaínas, donde se abordó una metodología denominada dispersión de la matriz en fase sólida (Matrix Solid-phase dispersión. MSPD, por sus siglas en inglés), la cual, es una técnica ampliamente utilizada en la preparación de muestras para la extracción de constituyentes químicos de frutas y plantas. Es una técnica de preparación de la muestra de vanguardia y en tendencia, ya que permite una extracción selectiva y partición de los metabolitos de interés contenidos en la matriz (tejido vegetal). Con la finalidad de ampliar el catálogo de betalaínas existente en la literatura, se decidió validar la metodología utilizando muestras de betabel rojo (*Beta vulgaris*) y pitaya morada (*Hylocereus costaricensis*), identificándose un total de 86 betalaínas (31 betacianinas, 36 derivados de betacianinas y 19 betaxantinas), superando el número de analitos reportados en la literatura, finalmente se integró una base de datos compuesta por 140 betalaínas (112 betacianinas y 28 betaxantinas). Este capítulo fue publicado como artículo original en la revista *Molecules* en el año 2024.

El capítulo III detalla el perfil de betalaínas presentes en nuestra accesión de estudio que hemos nombrado “amaranto rojo” (*Amaranthus cruentus* L.), aislada en Valladolid, Yucatán. Con este capítulo se cubrió parte del objetivo específico 3) determinar el metaboloma del amaranto rojo, reportando 43 betalaínas que hasta la fecha no se habían documentado en la literatura. En este capítulo se aplicó la metodología detallada en el capítulo II para la exploración del perfil de betalaínas. Este capítulo fue publicado como artículo original en la revista *Journal of Mexican Chemical Society* en el año 2023.

El capítulo IV detalla el cribado farmacológico y el perfil fitoquímico del amaranto rojo (*Amaranthus cruentus* L.), donde se presenta evidencia científica (ensayos *in vitro* y modelos murinos *in vivo* y *ex vivo*) que describe al “amaranto rojo” como un alimento funcional por poseer fitoquímicos bioactivos. En este capítulo se amplió el metaboloma del amaranto rojo integrando el perfil de flavonoides, ácidos orgánicos y ácidos cinámicos, completando el objetivo específico dos de la tesis. Además, se logró el objetivo específico 5) evaluación de la actividad farmacológica en modelos de diabetes e hipertensión del amaranto rojo, complementando nuestra evaluación farmacológica con una aproximación farmacodinámica *in silico*, con las enzimas claves de los modelos mencionados. Este capítulo fue publicado como artículo original en la revista Journal Molecules en el año 2024.

Finalmente, en el capítulo V se integran la discusión general, conclusiones y perspectivas de la tesis.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN *IN SILICO* POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y EL ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS) PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL BETALÁMICO: IDENTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS EN PITAYA ROJA

2.1. Resumen

Las betalaínas, pigmentos naturales derivados de la tirosina, contienen nitrógeno y son solubles en agua. Se clasifican en dos grupos principales: betaxantinas (amarillas) y betacianinas (rojas). Las betalaínas presentan propiedades fisicoquímicas favorables, como solubilidad en agua y estabilidad en diferentes intervalos de pH, lo que las hace atractivas para la industria alimentaria. Para facilitar la identificación de betalaínas y ampliar el conocimiento sobre fuentes naturales de estos pigmentos, se desarrolló un catálogo con 140 betalaínas conocidas (112 betacianinas y 28 betaxantinas). Se utilizó el software MassFrontier para generar picos fragmentados y determinar las estructuras químicas y los iones precursores protonados de cada betalaína. Los análisis de MS/MS y MS de betanina, el extracto de remolacha y el extracto de pitaya roja permitieron establecer una huella dactilar (fingerprint) distintiva de las betalaínas, el cuál es escaso en literatura y cuyo análisis era importante para establecer los estándares comparativos a ser utilizados en estudios de betalaínas de cualquier otro grupo de plantas, revelando iones característicos de betacianinas, y derivados de betacianinas y betaxantinas. Además, se propuso un método analítico por UHPLC-MS/MS con analizador Orbitrap, que permite la identificación de betalaínas con alta resolución espectrométrica. La preparación de muestras se realizó mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), brindando una plataforma analítica robusta para el análisis de extractos naturales. Se determinaron 86 betalaínas (31 betacianinas, 36 derivados de betacianinas y 19 betaxantinas) en pitaya roja. Un hallazgo clave fue la identificación de un ion distintivo con m/z 211.07 en las betaxantinas. Finalmente, se detectaron cuatro betalaínas desconocidas que presentaban la huella dactilar de betalaínas, aunque se requiere más investigación para revelar su estructura completa. En conjunto, consideramos que el uso continuo de la huella dactilar de las betalaínas ayudará a aumentar su identificación en estudios enfocados en revelar la función biológica de las betalaínas o en el desarrollo de tecnologías basadas en estos colorantes naturales.

2.2. Introducción

Las betalainas son pigmentos naturales solubles en agua que contienen nitrógeno y poseen interesantes propiedades de absorción y emisión; estas contienen dobles enlaces conjugados y al menos un nitrógeno heterocíclico. Los estudios sobre las propiedades de las betalainas han revelado que, además de sus propiedades espectroscópicas y fluorescentes, las betalainas tiene funciones ecológicas debido a que son esenciales para atraer polinizadores y dispersores al proporcionar color a los tejidos vegetales; contribuyen a la tolerancia a la sequía y al estrés lumínico excesivo (Jain & Gould, 2015; Khan y Giridhar, 2015); adicionalmente, presentan actividades farmacológicas destacables, tales como antiinflamatorias, antioxidantes, antihipertensivas, antidiabéticas e inmunomoduladoras, así como por sus propiedades quimioprotectoras contra el cáncer (Miguel, 2018; Araujo-León *et al.*, 2024a). Las betalainas también se han utilizado como pigmento alimentario natural, lo cual ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA) y por el Estándar Nacional de Seguridad Alimentaria en China (National Food Safety Standard Use for Food Additive, GB2760-2011) (USDA Foreign Agricultural Service, 2013). La industria alimenticia y biotecnológica desde hace más de 20 años ha buscado nuevos pigmentos, con la finalidad de reemplazar los colorantes sintéticos por naturales, debido a la constante demanda de la sociedad por productos naturales y amigables a la salud (Fernandez-Lopez *et al.*, 2013). En enero de 2025 la FDA revocó la autorización del colorante FD&C Rojo No. 3 (eritrosina) en alimentos y medicamentos, debido a estudios realizados en roedores, donde se observó el desarrollo de cáncer a dosis altas (FDA, 2025). Con base en esto, los pigmentos naturales surgen como una alternativa con menor riesgo para la salud.

Se ha documentado que existen betalainas específicas derivado de las fuentes de donde se extrajeron (Polturak y Aharoni, 2018), esto sugiere que los métodos analíticos desempeñan un papel crucial para su identificación selectiva. Las betalainas se han denominado cromo-alcaloides vacuolares solubles en agua (Gonçalves *et al.*, 2012); a diferencia de los carotenoides, las clorofilas y las antocianinas que están omnipresentes en el reino vegetal, las betalainas se encuentran restringidas en su mayoría en el orden Caryophyllales, sólo dos familias del orden Caryophyllales producen antocianinas: Caryophyllaceae y Molluginaceae (Stafford 1994; Strack *et al.*, 2003). Estudios bioquímicos, genéticos y evolutivos han revelado que la producción específica de betalainas en el orden Caryophyllales radica en la conservación y eventos de duplicación de los genes que

codifican enzimas en la vía biosintética de las betalaínas (Timoneda *et al.*, 2019); también se han documentado betalaínas en hongos del género *Amanita* y la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Contreras-Llano *et al.*, 2019; Stintzing & Schliemann, 2007; Stafford, 1994)

Las betalaínas se clasifican en dos categorías: betacianinas (rojo-violeta) y betaxantinas (amarillo-naranja) (Figura 13). En las plantas, durante la biosíntesis de las betalaínas, el ácido betalámico se condensa con ciclo-DOPA o con ciclo-DOPA glicosilado. Los grupos de azúcar pueden ser acilados con ácidos orgánicos aromáticos, como los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico, sinápico y malónico, para evitar la degradación de las betalaínas por β -glucosidasas. Las betaxantinas resultan de la condensación del ácido betalámico con un grupo imino o amino de aminoácidos (Figura 14). La diversidad química de las betalaínas aumenta debido a la epimerización en el centro quiral C-15 (Stintzing *et al.*, 2004).

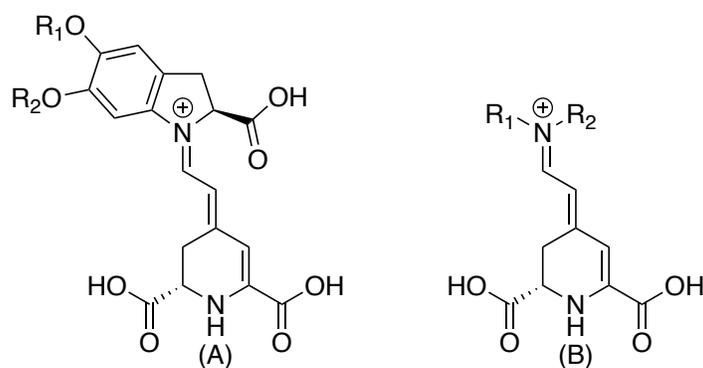


Figura 13. Esqueleto base de: (A) betacianinas y (B) betaxantinas.

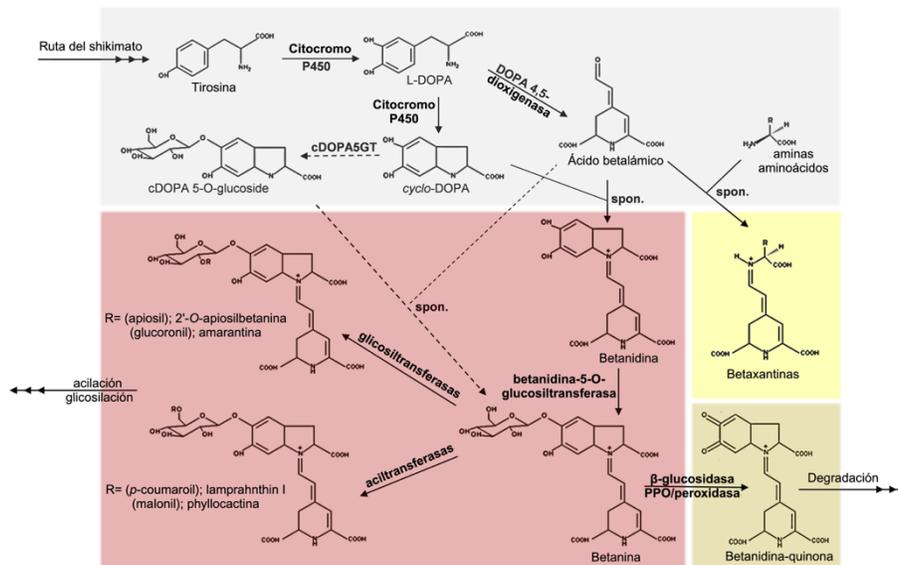


Figura 14. Ruta biosintética de betalainas (Polturak y Aharoni, 2018).

Las betalainas, como se ha dicho, se producen a partir de un precursor de un aminoácido aromático (L-tirosina), este precursor ha sido poco estudiado en el papel de la biosíntesis de las betalainas, la L-tirosina es necesaria para la biosíntesis de proteínas en todas las células vivas y también sirve como precursor de una amplia gama de productos naturales de plantas, que incluye plastoquinonas, tocoferoles, ácido rosmarínico, alcaloides de isoquinolina, catecolaminas y betalainas. La tirosina se sintetiza a partir del ácido prefénico, el subproducto de la ruta del ácido shikímico. Se ha estudiado que la limitada concentración de tirosina puede explicar las diferencias entre las producciones de betaxantinas (amarillas) y betacianinas (rojas); esto fue estudiado en dos variedades de *Beta vulgaris*: remolacha roja y amarilla. Se encontró que la remolacha roja tiene un conjunto completo de genes biosintéticos de betalainas (Figura 15A) y que las remolachas amarillas son homocigóticas recesivas en el alelo *R* que codifica CYP76AD1, que es responsable de la oxidación del L-DOPA a ciclo-DOPA y, por lo tanto, deficiente en betacianinas rojas (Figura 15B). Además, recientemente se descubrió que CYP76AD1 es una enzima bifuncional y también desempeña el papel principal en la reacción de la hidroxilación de tirosina a L-DOPA. Este estudio determinó que las remolachas amarillas no sólo son defectuosas en la oxidación del L-DOPA, sino que también reducen sustancialmente la oxidación de tirosina a L-DOPA, que es el paso comprometido de la biosíntesis de betalainas y, por lo tanto, determina los niveles generales de pigmentos de betalainas (Wang *et al.*, 2017).

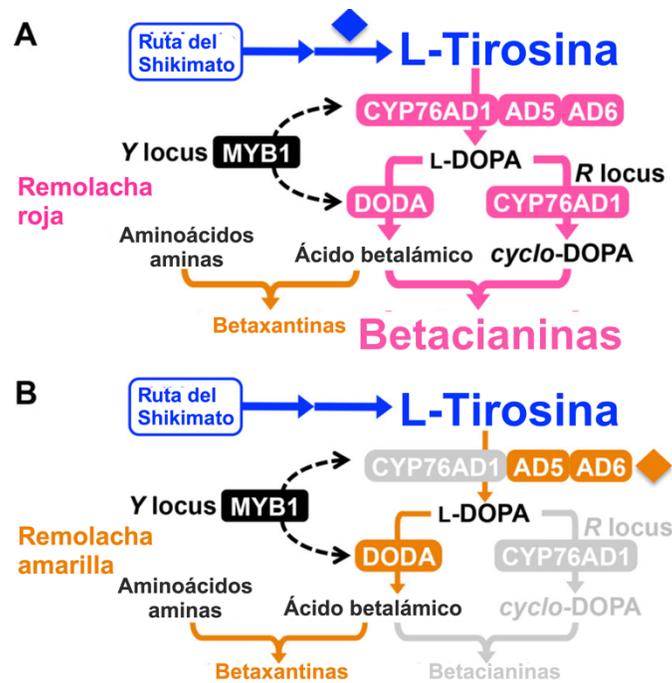


Figura 15. Modelo propuesto de biosíntesis de tirosina y betalaina en: A) remolacha roja y B) remolacha amarilla (Wang *et al.*, 2017).

La degradación de las betalainas o sus derivados implica descarboxilación mediante la eliminación de grupos carboxilo y deshidrogenación oxidativa. Se ha señalado que varios factores impactan la estabilidad de las betalainas, lo que provoca efectos perjudiciales sobre el pigmento. Estas causas incluyen la temperatura de almacenamiento de los alimentos, el pH y la luz, entre otras, las cuales han sido ampliamente revisadas por Sadowska-Bartosz y Bartosz (2021). La descarboxilación de betanina puede conducir a la formación de 17-descarboxibetanina, mientras que la deshidrogenación de betanina provoca la formación de neobetanina. La descarboxilación y deshidrogenación de betanina también ocurre al mismo tiempo, por ejemplo, 2,17-bidecarboxi-2,3-deshidro-neobetanina (Figura 16); estas modificaciones a la estructura base permiten conjuntamente generar diferentes espectros de colores.

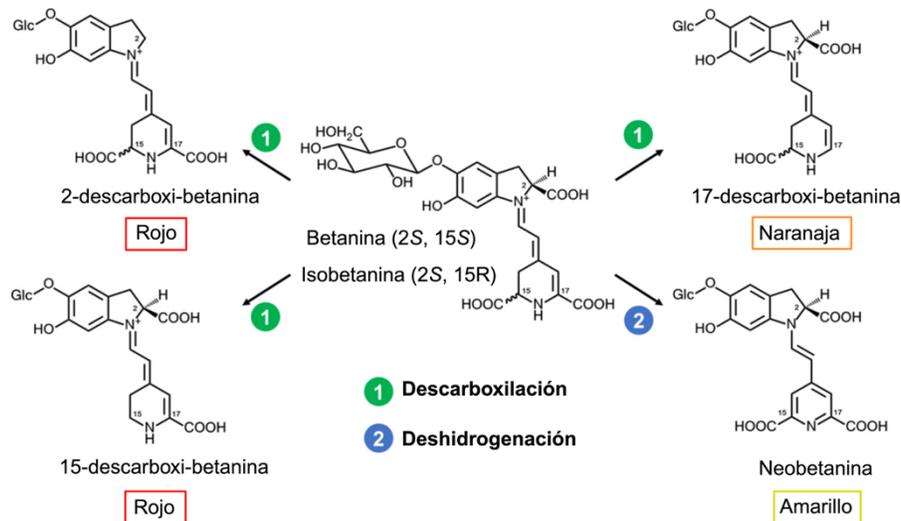


Figura 16. Derivados químicos de betanina producidos por (1) descarboxilación y (2) deshidrogenación (Xie & Chen, 2021).

La fuente vegetal más estudiada y comúnmente conocida de betalainas pertenece a la familia Amaranthaceae, en específico, a la especie *Beta vulgaris*, que es comúnmente conocida como remolacha o betabel, la cual posee un color rojo intenso, de donde se aisló por primera vez la betanina (Gengatharan *et al.*, 2015). Sadowska-Bartosz & Bartosz (2021) indican que las plantas comestibles del orden Caryophyllales que producen betalainas incluyen:

- Raíces: *Beta vulgaris* (betabel/remolacha).
- Tubérculos: *Ullucus tuberosus* Caldas (ulluco o papalisa).
- Hojas: *B. vulgaris* ssp. *cicla* (acelga).
- Granos y vegetales de amaranto: *Amaranthus cruentus*, *A. caudatus*, *A. hybridus* y *A. tricolor*.
- Frutas de los géneros: *Opuntia*, *Eulychnia* y *Selenicereus* (*Hylocereus*).

En los frutos del género *Selenicereus* existen tres colores diferentes asociados con betalainas (Le Bellec *et al.*, 2006; Ortiz-Hernández *et al.*, 2012):

1. Frutas con piel roja y pulpa blanca (*Selenicereus undatus* (Haw.) D.R.Hunt).

2. Frutas con piel roja y pulpa roja (*S. costaricensis* (F.A.C.Weber) S.Arias & N.Korotkova y *S. monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt).
3. Frutas con piel rosada y pulpa blanca o piel amarilla y pulpa blanca (*S. megalanthus* (K.Schum. ex Vaupel) Moran).

Entre estas especies, *S. undatus* es la más ampliamente distribuida y cultivada en el mundo, incluyendo países como Vietnam, China, Indonesia, Estados Unidos y México, entre otros. En *Selenicereus* spp., al igual que en otras Caryophyllales, ante la falta de estándares analíticos para la determinación de betalainas se ha recurrido a la síntesis química de estos compuestos, su purificación y separación, para elucidar sus actividades biológicas (Cai *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2024; Escribano *et al.*, 2017; Esteves *et al.*, 2022; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021; Minh Thu *et al.*, 2019; Strack *et al.*, 2003; Tuwalska *et al.*, 2014; Wybraniec & Stalica, 2016; Xu *et al.*, 2024).

Se han documentado diversas actividades biológicas de las betalainas en *Selenicereus* spp.: actividad antioxidante (Vaillant *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2018; Rodrigues Vieira *et al.*, 2024), estabilidad térmica de las betacianinas en jugo (Herbach *et al.*, 2004; Wybraniec & Mizrahi, 2005; Wybraniec *et al.*, 2006; Wong & Siow, 2015), estabilidad de las betalainas tanto en su forma pura como en polvos de cáscara de pitaya secados por aspersion (Ee *et al.*, 2014; Herbach *et al.*, 2005; Gengatharan *et al.*, 2015), actividad antibacteriana (Nurmahani *et al.*, 2012; Yong *et al.*, 2018; Zambrano *et al.*, 2019) y actividad antiviral, particularmente contra el virus de la influenza A (IAV) en células A549 (Lim *et al.*, 2024). Dado que múltiples betalainas pueden coexistir dentro de una misma especie, como ocurre en otras plantas de Caryophyllales, la identificación y caracterización de estas moléculas requiere de una cobertura metodológica analítica selectiva, que permita evaluar de manera precisa la influencia del amplio espectro de betalainas presentes (Butera *et al.*, 2002; Mosshammer *et al.*, 2007).

La caracterización estructural y la investigación de las betalainas mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o espectrometría de masas (MS) no solo proporcionan oportunidades para comprender la biología de estos pigmentos, sino que también permiten distinguir betalainas aún no identificadas. La HRMS puede definirse como un analizador de masas en el que el poder de resolución de masas es superior a 10,000, lo que permite que los datos produzcan mediciones de masas de alta precisión (Aydoğan, 2020). En este trabajo utilizaremos un analizador de trampa de iones orbitante, el Orbitrap,

el cual, a diferencia de analizadores simples, permite diferenciar las interferencias isobáricas en la matriz y poder aislar los iones objetivos debido al alto poder de resolución de las masas. Además, es posible predecir la fórmula química de cada ion, aumentando la potencia del análisis. La fórmula química, se puede derivar del ion precursor y su patrón isotópico; posteriormente, la estructura del compuesto candidato puede verificarse según los fragmentos obtenidos mediante los experimentos MS/MS. Para garantizar una identificación fiable de los compuestos, los resultados de la MS deben cumplir dos conjuntos de criterios internacionales, es decir, la Decisión de la Comisión 2002/657/EC y la iniciativa de estándares de metabolómica (MSI). En primer lugar, es necesaria una alta precisión de la masa (error de masa inferior a 5 ppm) de los iones precursores y su ion producto para identificar un compuesto (European Commission, 2002; Schymanski *et al.*, 2014). Además, el nivel 2 de identificación de MSI requiere que los espectros de las estructuras probables coincidan sin ambigüedades con la literatura y/o los fragmentos de MS/MS de diagnóstico y la información del compuesto original. Finalmente, cuando la HRMS es combinada con una técnica rápida y eficiente como MSPD es posible el aislamiento de fracciones más puras de betalainas a partir de tejido vegetal. Esta técnica se basa en la homogeneización del tejido vegetal con un adsorbente (generalmente suele ser C18) para provocar la disrupción celular y con ello poder extraer los metabolitos al adsorbente, y con ello iniciar el proceso de partición para la purificación de las fracciones (Jin *et al.*, 2019).

Para enriquecer el catálogo de betalainas que existe en la literatura, se requiere comprender la biología de las especies productoras de betalainas, por ejemplo, el fraccionamiento preparativo de betalainas extraídas de *Phytolacca americana* L. ha llevado al descubrimiento de nuevas características estructurales de (15S)-betanina y (15R)-isobetanina, lo que ha contribuido a la expansión del catálogo de betalainas a 17 compuestos (Jerz *et al.*, 2008; Minh *et al.*, 2019). Este catálogo se ha ampliado aún más gracias a la combinación de cromatografía líquida (LC) con espectrometría de masas (MS), debido a los tiempos de retención distintos entre los epímeros de betalainas durante el análisis cromatográfico, lo que ha permitido diferenciarlos con mayor selectividad. Aunque se han identificado candidatos a betalainas en los cinco niveles de confianza propuestos para la identificación de metabolitos (Sumner *et al.*, 2007; Viant *et al.*, 2017), la mayoría se ha determinado en el nivel 4, basándose en la fórmula molecular, la determinación del estado de carga, la identificación de iones aductos, la distribución de abundancia isotópica y la absorción en UV-Vis (Von Elbe, 2001; Xie & Chen, 2021; Araujo-León *et al.*, 2023b).

Hasta la fecha, el catálogo de betalaínas ha crecido significativamente, incluyendo:

- 22 betalaínas (15 betaxantinas y 7 betacianinas) en betabel (*Beta vulgaris*) (Slatnar *et al.*, 2015).
- 24 betalaínas (18 betaxantinas y 6 betacianinas) en 10 cultivares mexicanos de nopal tunero (*Opuntia spp.*) (Castellanos-Santiago *et al.*, 2008).
- 28 betalaínas (19 betaxantinas y 9 betacianinas) en acelga suiza (*Beta vulgaris ssp. cicla*) (Kugler *et al.*, 2004).
- 43 betalaínas (30 betaxantinas y 13 betacianinas) en amaranto (*Amaranthus cruentus*) (Araujo-León *et al.*, 2023b).
- 48 betalaínas (22 betaxantinas y 26 betacianinas) en tres cultivares de betabel (*Beta vulgaris*) (Kusznierewicz *et al.*, 2021).
- 68 betalaínas (34 betaxantinas y 34 betacianinas) en Djulis (*Chenopodium formosanum* Koidz) (Xie & Chen, 2021).
- 146 betacianinas, la mayoría con un peso molecular superior a 1,000 Da, en *Bougainvillea glabra* Choisy (Wybraniec *et al.*, 2010).

Debido a que algunas betacianinas son específicas de ciertas especies, el número total de betacianinas identificadas en diversas fuentes botánicas supera las 200, lo que evidencia la gran diversidad estructural de estos pigmentos naturales (Wybraniec *et al.*, 2010; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021).

Este capítulo tiene como objetivo examinar la huella dactilar de las betalaínas en muestras compatibles con espectrometría de masas mediante la preparación de muestras basada en dispersión en fase sólida de matriz (MSPD, por sus siglas en inglés), análisis por LC-MS/MS y la interpretación de espectros con la ayuda de bibliotecas espectrales *in silico* de betalaínas.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Reactivos químicos

Se usó como disolventes para la fase móvil en el HPLC metanol (MeOH), agua (H₂O) y ácido fórmico, todos de grado espectrométrico (99.99%). Debido a la falta de un estándar analítico, utilizamos el extracto estandarizado por Sigma-Aldrich de remolacha (*Beta vulgaris*) que se proporciona disuelto en dextrina. Como adsorbente de extracción utilizamos C18 con un tamaño de partícula de 10 µm y cartuchos de extracción en fase sólida de 1,000 mg de C18.

2.3.2. Material vegetal

Para comenzar con la puesta a punto del método analítico y el método por HPLC-MS, utilizamos dos extractos preparados en el laboratorio: uno de “remolacha roja” (*Beta vulgaris*) y otro de pitaya roja (*Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose). Los materiales vegetales se prepararon con un molino electrónico para extraer el jugo (la fibra fue desechada). Se colectaron 50 mL de jugo de cada uno de ellos. Inmediatamente, se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente, se liofilizaron a -55 °C y 0.1 mmHg durante 72 h. El extracto liofilizado se almacenó en un recipiente ámbar para prevenir la fotodegradación y se almacenó a -20 °C, hasta el día de su análisis.

2.3.3. Extracción por MSPD (*Matrix Solid-phase Dispersion*)

Para el proceso de MSPD, se tomaron 100 mg tanto del jugo liofilizado (remolacha/betabel o pitaya) o tejido vegetal de amaranto y se mezclaron de manera independiente en un mortero con pistilo con 400 mg de adsorbente BondElut C18 con un tamaño de partícula de 40 µm, hasta obtener un sólido uniforme. La mezcla obtenida se transfirió cuantitativamente a un cartucho de extracción en fase sólida, el cual se colocó en un sistema Visciprep con un vacío de aproximadamente -20 mmHg, que generó un caudal de aproximadamente 1 mL/min. La primera elución se realizó con H₂O, pasando a través del cartucho un volumen de 9 mL, los cuales se colectaron en un matraz Erlenmeyer. Una vez finalizada esta etapa, se comenzó con la segunda elución con una mezcla de MeOH:H₂O (1:1, v/v) y se pasó a través del cartucho un volumen de 9 mL, que, de igual forma, se colectaron en otro matraz Erlenmeyer para, finalmente, realizar el mismo procedimiento con MeOH al 100%. La fracción acuosa se congeló a -80 °C y se liofilizó. A la segunda fracción (MeOH:H₂O) se le evaporó el MeOH con un evaporador de centrifuga

con vacío a 40 °C durante 60 min, posteriormente el agua residual se congeló a -80 °C y se liofilizó. La tercera fracción (MeOH) se evaporó hasta sequedad y se almacenó a -20 °C para futuros estudios metabolómicos en la búsqueda de moléculas como flavonoides o ácidos orgánicos.

2.3.4. Análisis e identificación de betalainas utilizando UHPLC_UV-Vis-MS/MS Orbitrap

Las muestras liofilizadas de cada una de las fracciones se resuspendieron en 600 μ L de H₂O acidificada al 1% con ácido fórmico y se colocaron en viales ámbar para cromatografía grado HPLC-MS con septo. El sistema UHPLC tomó de manera automática una alícuota de 20 μ L de muestra y se inyectó al sistema. Todas las muestras se analizaron en un equipo UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific), el cual tiene una bomba cuaternaria, un auto muestreador, un compartimiento de horno para columna y un módulo de detector de UV-Vis. El proceso cromatográfico se llevó a cabo con una columna de C18 Hypersil Gold de 100 mm \times 2.1 mm y un tamaño de partícula de 1.9 μ m, a 45 °C. El sistema de elución consistió en un gradiente con H₂O (A) y MeOH (B), ambos disolventes fueron acidificados al 0.1% con ácido fórmico con un caudal de 0.3 mL/min. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 0-2 min se mantuvo el sistema con una proporción de 95% A, posteriormente de 2-18 min la línea B tuvo un incremento del 5% al 100%. El tiempo total del análisis fue de 40 min y se colectaron los datos espectrofotométricos a 480 y 540 nm.

El espectrómetro de masas utilizado fue un Velos Pro – Orbitrap (Thermo Scientific), utilizando una fuente de ionización ESI en modo positivo. Las condiciones de la fuente fueron las siguientes: el voltaje del cono fue de 4.5 kV, la temperatura del capilar a 300 °C, la temperatura del revestimiento a 180 °C y el gas de revestimiento (*sheat gas* en inglés) a 40 unidades arbitrarias y el gas auxiliar a 15 unidades arbitrarias. La HRMS se obtuvo mediante dos experimentos, el primero fue una colección de los iones totales (MS1) en un intervalo de masa de 100 a 1,000 *umas* o Da, con una resolución de 60,000, y el segundo experimento fue una adquisición de datos dependientes con una colisión en HCD a 50 eV para obtener espectros MS2.

2.3.5. Generación de la biblioteca de fragmentación *In silico* basada en MassFrontier

Las estructuras químicas conocidas de betalaínas fueron dibujadas utilizando ChemDraw Professional 16.0, siguiendo las directrices de la American Chemical Society (ACS-1996) (Esteves *et al.*, 2022; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2021). Posteriormente, estas estructuras fueron ingresadas en el Editor de Estructuras del software MassFrontier 7.0 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para su análisis. Se especificó la carga con el fin de generar las masas precursoras $[M+H]^+$ y los iones fragmento de forma *in silico*. Para ello, se emplearon las bibliotecas HighChem ESI Pos 2008 y HighChem Fragmentation Libraries. Los parámetros de fragmentación fueron configurados en modo estérico óptimo, permitiendo reacciones de resonancia para la compartición de electrones, la estabilización de carga y la isomerización de radicales. Finalmente, los picos de fragmentación y las masas precursoras obtenidas se encuentran en el material suplementario del trabajo reportado por Araujo-León *et al.*, 2024b.

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Diseño de la librería *in silico* de betalaínas utilizando el software MassFrontier

Con la finalidad de entender la diversidad de las betalaínas, generamos una biblioteca de espectros a partir de los iones precursores. Se inició realizando un análisis de todas las betalaínas reportadas (Esteves *et al.*, 2022; Xie & Chen, 2021; Wybraniec *et al.*, 2010; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021) y luego creamos estructuras químicas y masas precursoras, a las cuales se les realizó su fragmentación *in silico* utilizando el software MassFrontier 7.0 (Kind & Fiehn, 2010). En la base de datos se identificaron 140 betalaínas, que pueden agruparse en betacianinas y betaxantinas (Figura 17). Nuestra base de datos contiene 112 betacianinas y 28 betaxantinas, lo que corresponde al 80 y 20%, respectivamente. Posteriormente, cuando las betacianinas se clasificaron en sus diferentes tipos, de acuerdo a lo reportado por Xie & Chen (2021) y Kumorkiewicz-Jamro *et al.* (2021), se observó que el grupo más amplio fue de tipo betanina, representando el 39.4% del total de betacianinas, seguida por los tipos amarantina, melocactina, apiocactina, gomfrenina y glabranina. En cuanto a las clases de betaxantinas, según lo informado por Esteves *et al.* (2022), la clase predominante fue la de tipo hidrofóbico con un 39.3%, seguida de casos especiales que incluyen a las betaxantinas de ácido γ -aminobutírico-bx, dopamina-bx, L-

DOPA-bx, tiramina-bx, 3-metoxi-tiramina-bx, 5-hidroxinorvalina-bx, sulfóxido de metionina-bx, seguidas por betaxantinas con carga positiva, sin carga y con carga negativa.

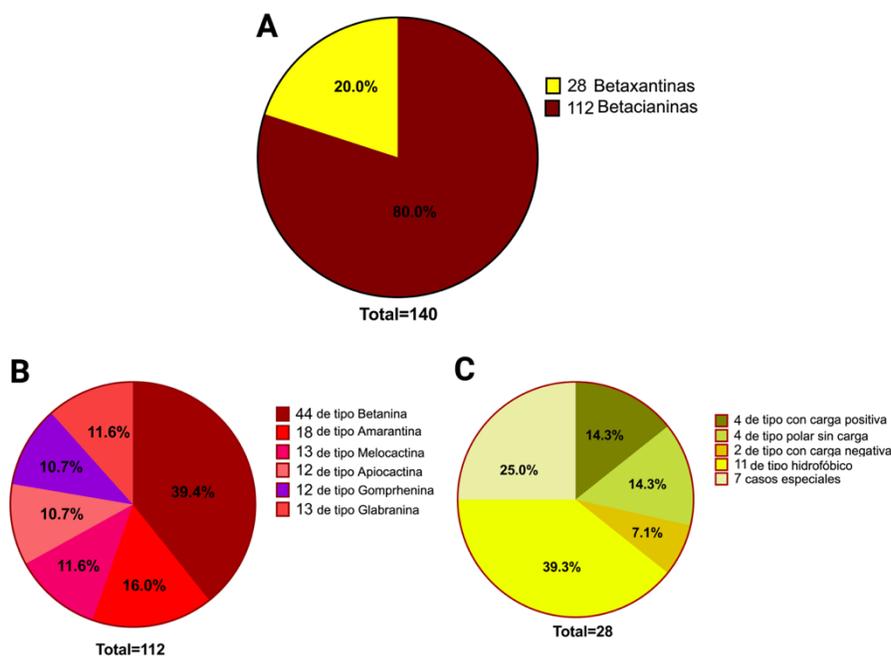


Figura 17. Gráfica de las clases de betalaínas utilizadas en la biblioteca espectral. (A) Tipos de betalaína; (B) tipos de betacianina; y (C) tipos de betaxantina (Araujo-León *et al.*, 2024b).

Con la base de datos generada se analizó la distribución de la masa molecular de las betalaínas; las masas del ion molecular $[M+H]^+$ de las betalaínas oscilaron entre 250 y 1,350 Da. Se observó que existen diferencias entre las betacianinas y betaxantinas, la masa del ion molecular $[M+H]^+$ no se superponen (**Figura 18**). Las betaxantinas, que tienen masas más pequeñas $[M+H]^+$, alcanzan hasta 400 Da, mientras que las betacianinas no sólo presentan masas moleculares más grandes, sino que también se observan isómeros en C-15 de la estructura principal de las betacianinas (Figura 19-A). Las diferencias entre las masas de las betacianinas y betaxantinas se debe a la presencia de grupos glicosídicos unidos en las betacianinas, mientras que las betaxantinas contienen grupos amino o derivados de aminoácidos. La base de datos presentada en el material suplementario del trabajo reportado por Araujo-León *et al.* (2024b) muestra la estructura química, la fórmula química, la masa monoisotópica, el ion $[M+H]^+$ y la lista de masas de los iones producto del aducto $[M+H]^+$ para cada betalaína. En esta biblioteca se compila una lista de masas de

iones tanto compartidos como específicos para betacianinas y betaxantinas. Ambas comparten la estructura molecular del ácido betalámico, y la estructura de la aglicona con un m/z de 389.0979, excepto en el caso de betacianinas descarboxiladas o deshidrogenadas. Los iones específicos para cada uno de los tipos de betacianinas fue el siguiente: tipo betanina con m/z 551.1508, tipo amarantina con m/z 727.1829, tipo melocactina con m/z 713.2036, tipo apiocactina con m/z 683.1930, tipo gomfrenina con m/z 551.1508, tipo glabranina con m/z 713.2036, además de los iones específicos para las clases de betaxantinas. En las betacianinas, los cambios adicionales en la m/z están asociados con la adición de sustituyentes o la pérdida de un grupo H_2 o carboxílico. Actualmente, hasta donde sabemos, contiene la colección más grande de betalainas disponible (Araujo-León *et al.*, 2024b).

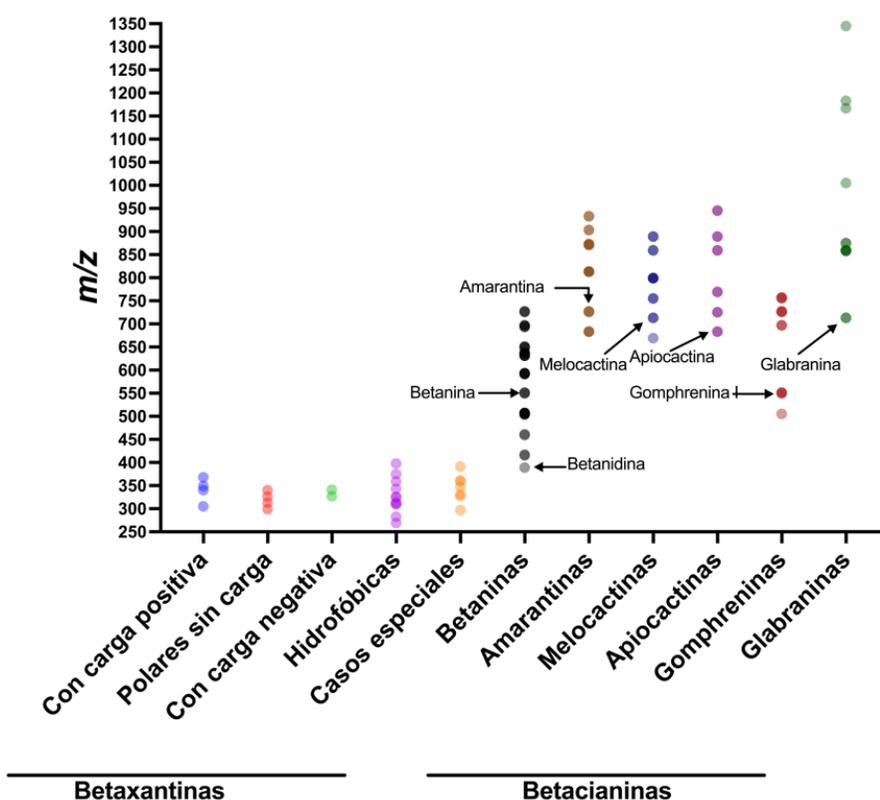


Figura 18. Distribución de las masas de los aductos $[M+H]^+$ de las betaxantinas y betacianinas (Araujo-León *et al.*, 2024b).

La resolución cromatográfica de los enantiómeros en betalaínas no requirió el uso de columnas con una fase estacionaria quiral. Por ejemplo, se ha informado en numerosos estudios que la isobetanina tiene un tiempo de retención más prolongado que la betanina en cromatografía de fase reversa de C18 (Xie & Chen, 2021; Araujo-León *et al.*, 2023b; Gonçalves *et al.*, 2012; Schliemann *et al.*, 1999). La diferencia en el tiempo de retención cromatográfica entre la betanina y la isobetanina se ha atribuido a su estereoquímica única en la posición C-15, lo que afecta su interacción con la columna cromatográfica (Stintzing *et al.*, 2004).

Para estudiar con mayor detalle la betanidina, que es la aglicona de casi todas las betacianinas con m/z 389.09, realizamos una adquisición de MS/MS mediante fragmentación con HCD de alta energía a 50 eV en un experimento de adquisición dependiente de datos y la comparamos con un análisis en MS de múltiples etapas con disociación inducida por colisión (CID) (Figura 20). En el análisis se identificaron características clave de fragmentación, incluyendo iones producto comunes como m/z 345.10 debido a la pérdida de un grupo carboxilo y m/z 343.09 debido a la pérdida de un grupo carboxilo más H_2 , así como los iones con m/z 150.05, 194.04, 178.05, 132.04 y 106.06.

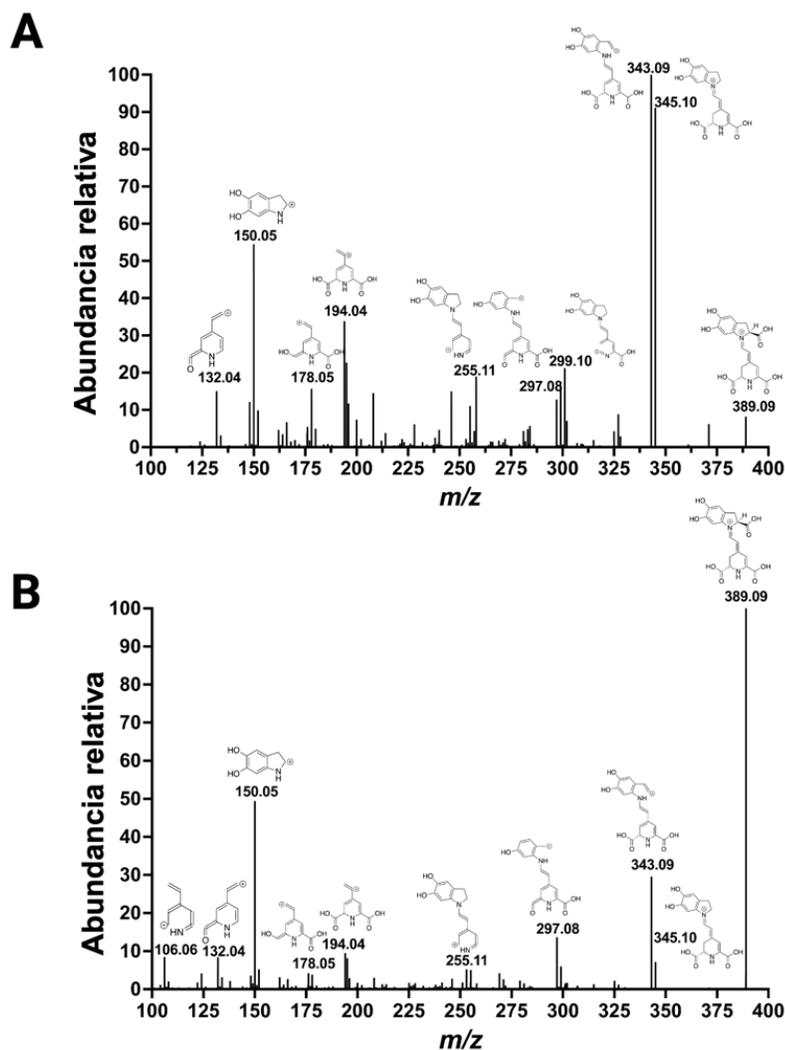


Figura 20. Espectro de masas MS/MS de la betalaina. (A) Espectro MS/MS del ion m/z 551.1495 fragmentado con HCD de alta energía a 50 eV. (B) Espectro MS3 obtenido con el ion con m/z 389.09 fragmentado con CID a 35 eV (551,1495 CID35 → 389 CID35 →) (Araujo-León *et al.*, 2024b).

La betanidina descarboxilada sigue la estructura del 5,6-dihidroxi-indol, y las dos cetonas unidas al anillo de piridina fueron asignaciones estructurales destacadas. Además, para elucidar otros iones de betalaínas y facilitar su identificación, se examinaron los espectros MS2 de la betanina en busca de iones con una abundancia relativa superior al 5% y con coincidencia estructural (Anexo I). Se descubrieron 23 iones con m/z entre 389.09 y 106.06. Trece de estos iones, con m/z mayor o igual a 253.09, y los iones con m/z 176.07 y 150.05, coincidieron con secciones estructurales exclusivas de las betacianinas, mientras que ocho iones distintos con m/z 211.07, 194.04, 179.08, 178.05, 166.05, 138.05, 132.04 y

106.06 coincidieron con la estructura central de las betalaínas que contienen el anillo de piridina. La información estructural deducida de estos iones sugiere que son fragmentos esenciales para la identificación de betalaínas, revelando su huella dactilar.

2.4.3. Identificación de betalaínas en el extracto de betabel

Utilizando el método previamente reportado (Araujo-León *et al.*, 2023b), basado en la dispersión en fase sólida de matriz (MSPD, por sus siglas en inglés), se seleccionó el análisis de extracto de betabel como material de referencia, ya que permitiría examinar un amplio número de betalaínas. Los datos de espectrometría de masas, obtenidos a partir de una adquisición dependiente de datos con fragmentación HCD de alta energía a 50 eV, fueron analizados mediante XIC, seleccionando aquellos iones conservados en las betalaínas como iones producto (Anexo I), incluidos los iones con m/z 211.07, 194.04, 179.08, 178.05, 166.05, 138.05, 132.04 y 106.06. En total, se identificaron 39 betalaínas (Anexo II). Además, 26 betacianinas de las betalaínas observadas fueron identificadas utilizando los iones con m/z 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09 y 389.09, que corresponden a la aglicona de la mayoría de las betacianinas, excepto los derivados de betacianinas que están descarboxiladas y deshidrogenadas. Los iones con m/z 389.09 y 150.05 también se han observado en el análisis de betalaínas de *Chenopodium formosanum* y *Amaranthus cruentus* (Xie & Chen, 2021; Araujo-León *et al.*, 2023).

Para el caso de los derivados de betacianina, no producen un ion producto con m/z 389.09, debido a que la aglicona ha perdido al menos un grupo carboxilo o ha sido deshidrogenado. La identificación de los derivados de betacianina se llevó a cabo utilizando los iones característicos de las betalaínas (Anexo I). Sin embargo, la confirmación de los carbonos sometidos a descarboxilación requerirá una mayor investigación, ya que la espectrometría de masas no puede identificar los carbonos que han sufrido estas reacciones de descarboxilación u oxidación. Existen datos que respaldan la hipótesis de descarboxilación en los carbonos C-2, C1-5 o C-17, donde se ha purificado por cromatografía de fase reversa C18 (Jerz *et al.*, 2008; Sumner *et al.*, 2007; Viant *et al.*, 2017).

En el extracto de betabel se observaron nueve derivados de betanina y cuatro derivados de neobetanina (Anexo II). Los derivados de betacianina descarboxilados mostraron la pérdida de un grupo carboxilo en su estructura; por lo tanto, la masa del ion precursor era menor que la de su contraparte no modificada. Por ejemplo, la masa del ion

precursor de la betanina era m/z 551.1483, mientras que la masa del ion precursor de la 17-descarboxi-betanina era m/z 507.1594.

Los derivados de betacianina descarboxilados mostraron la pérdida típica de una fracción glucosídica con un m/z de 162.053 [$M + H - 162.053$], lo que explica, por ejemplo, el ion producto con m/z 345.10 o m/z 343.09 en las betaninas descarboxiladas (2-descarboxi-betanina, 15-descarboxi-betanina y 17-descarboxi-betanina) y en la neobetanina descarboxilada (por ejemplo, 2-descarboxi-neobetanina), respectivamente (Figura 21). La detección de estos iones coincidió con informes previos sobre el análisis de betalaínas (Wybraniec & Mizrahi, 2005; Xie & Chen, 2021; Wybraniec, 2005; Kumorkiewicz & Wybraniec, 2017). Al igual que los derivados de betacianina descarboxilados, los derivados de betacianina deshidrogenados mostraron la pérdida de H_2 en su estructura; por lo tanto, la masa del ion precursor fue menor que la de la betacianina no modificada, como se describió anteriormente (Herbach *et al.*, 2004). Las betacianinas y los derivados de betacianina deshidrogenados incluyen a la neobetanina con m/z 549.13, 2-descarboxi-2,3-deshidro-betanina con m/z 505.1435, 2-descarboxi-2,3-deshidro-isobetanina con m/z 505.1429, 2,17-bidescarboxi-2,3-deshidro-betanina con m/z 461.1538, 2-descarboxi-2,3-deshidro-neobetanina con m/z 503.1281 y 2,17-bidescarboxi-2,3-deshidro-neobetanina con m/z 459.134.

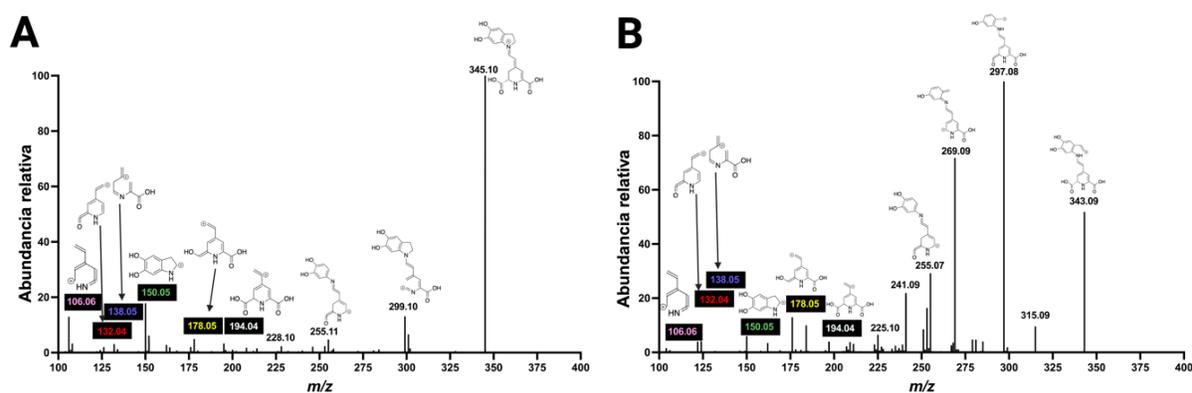


Figura 21. Espectros de masas de derivados de betacianina con HCD a 50 eV. (A) Espectro MS/MS de 2-descarboxi-betanina. (B) Espectro MS/MS de 2-descarboxi-neobetanina. Los iones centrales están resaltados en negro (Araujo-León *et al.*, 2024b).

El análisis de las betaxantinas se realizó basándose en la hipótesis de que se puede generar una huella dactilar de betalaínas a partir de la fragmentación del ion molecular en

un espectrómetro de masas, ya que las betacianinas y las betaxantinas comparten la estructura del ácido betalámico. Con base en este supuesto, se lograron identificar 13 betaxantinas en el extracto de betabel, incluidas 10 betaxantinas de tipo hidrofóbico y 3 betaxantinas de tipo polar sin carga (Anexo II). Se observó un ion producto con m/z 211.07 en las betaxantinas, el cual se asocia estructuralmente con el ácido betalámico, que porta un grupo nitrogenado unido al aminoácido correspondiente de las betaxantinas. Además, se identificaron iones estructuralmente relacionados con el anillo heterocíclico de pirimidina, tales como: m/z 194.04, 166.05, 138.05, 132.04, 130.05 y 106.06. Estos hallazgos fueron observados en los iones en los espectros de masas de glutamina-bx y triptófano-bx (Figura 22). Debido a la heterogeneidad de aminoácidos conjugados en las betaxantinas, definir iones específicos con valores de m/z que se ajusten a una estructura fuera del ion con m/z 211.07 no fue posible.

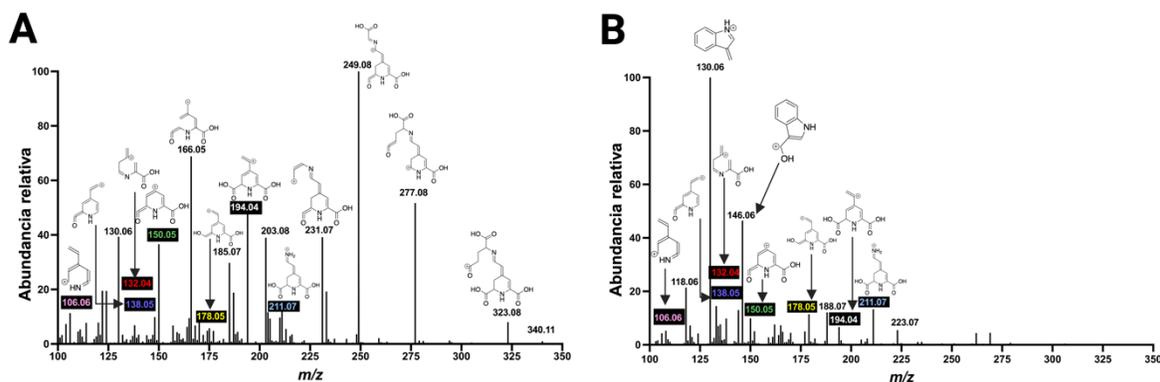


Figura 22. Espectros de masas de dos betaxantinas con HCD a 50 eV. (A) Espectro MS/MS de glutamina-bx. (B) Espectro MS/MS de triptófano-bx. Los iones centrales están resaltados en negro (Araujo-León *et al.*, 2024b).

2.4.4. Identificación de betalaínas en el extracto de pitaya roja

Asumiendo que las características de betalaínas identificadas en el extracto de betabel, junto con los iones característicos de betalaínas determinados (Anexo I), se utilizó esta información para analizar betalaínas en la pitaya roja. Evaluamos el extracto de pitaya roja siguiendo el método previamente reportado basado en MSPD, compatible con la espectrometría de masas (Araujo-León *et al.*, 2023b). Se identificó un total de 86 betalaínas en el extracto de pitaya roja, distribuidas en un tiempo de resolución cromatográfica de 12 minutos con diferentes niveles de abundancia (Tabla 2; Figura 23). Las betalaínas que observamos en el extracto ya habían sido identificadas previamente por otros

investigadores mediante LC-MS/MS o RMN (Esteves *et al.*, 2022; Xie & Chen, 2021; Araujo-León *et al.*, 2023b; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021; Spórna-Kucab *et al.* 2020; Kumorkiewicz *et al.*, 2019; Piattelli *et al.*, 1965), con excepción de cuatro betalaínas desconocidas. La abundancia de cada betalaína se determinó midiendo el área debajo del pico base del ion m/z correspondiente a cada betalaína analizada. En la identificación de betaxantinas y betacianinas en el extracto, se observaron 19 betaxantinas, las cuales representaron una baja abundancia en comparación con las 67 betacianinas identificadas, además este grupo de betacianinas se ubicó en un intervalo de m/z superior a 450. Con la identificación de las 86 betalaínas, en comparación con estudios previos reportados, logramos reportar el catálogo más extenso de betalaínas, dado que en la literatura previa únicamente se han identificado 8 betalaínas en la pitaya rojo-púrpura *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose (Stintzing *et al.*, 2002); 11 entre las variedades de pulpa roja y naranja de *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxb., y *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob. (García-Cruz *et al.*, 2017); 20 en la pulpa roja de *Hylocereus costaricensis*, la pulpa blanca de *Hylocereus megalanthus* (K.Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose (Barkociová *et al.*, 2021); y 23 en la pulpa roja de *Hylocereus polyrhizus* (F.A.C.Weber) Britton & Rose y *Hylocereus undatus* (Suh *et al.*, 2014).

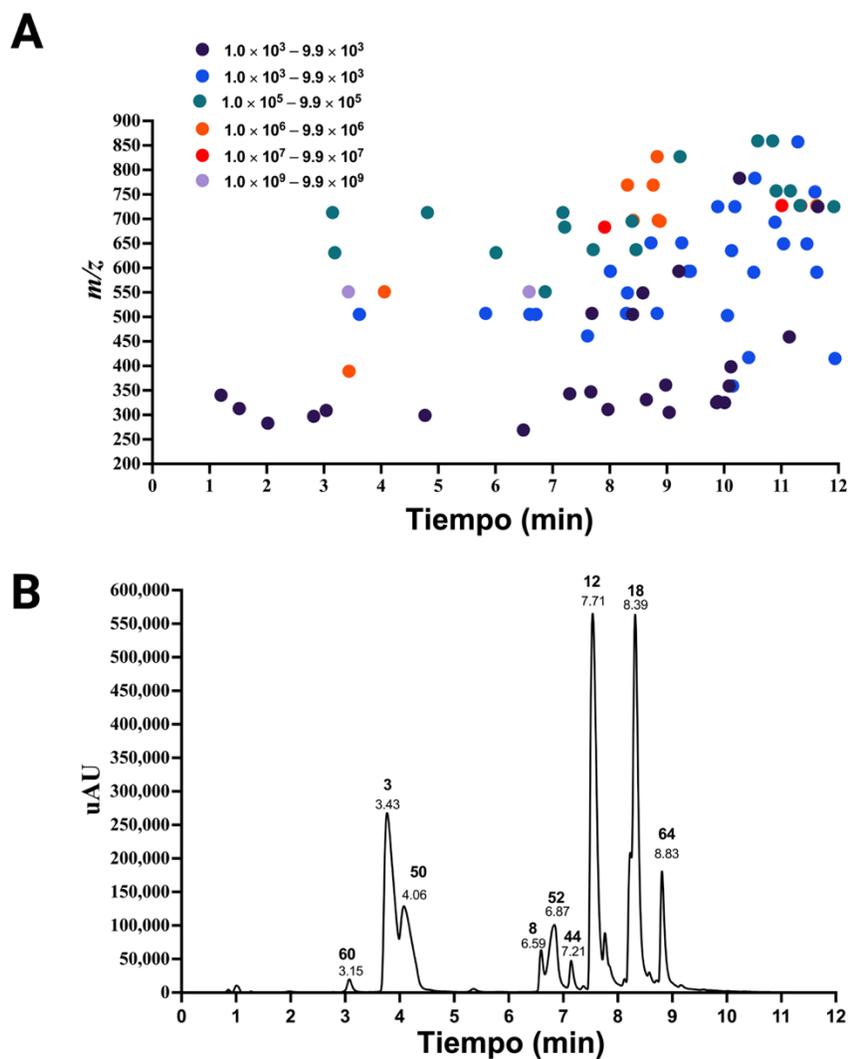


Figura 23. Resolución de las betalainas observadas en la pitaya roja. (A) La escala del círculo de color indica el cambio en el área medida del pico en la base del ion parental ($[M+H]^+$) para las betalainas. (B) Cromatograma de la pitaya roja a 540 nm. El pico muestra el tiempo de retención y el número de etiqueta de la betalaina. La **Tabla 2** contiene la lista completa de betalainas identificadas (Araujo-León *et al.*, 2024b).

Tabla 2. Datos cromatográficos y espectrométricos de las betalainas observadas en el extracto de *Hylocereus costaricensis*.

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
1	Ácido betalámico	3.23	0.94	C ₉ H ₉ NO ₅	212.0553	212.0545	-3.77	194.04, 166.05, 148.04, 138.05, 120.04, 106.03
Betaninas								
2	Prebetanina	3.19	0.93	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₆ S	631.1076	631.1052	-3.8	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
3	Betanina	3.43	1	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1483	-4.54	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
4	Betanidina	3.44	1	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₈	389.0979	389.0964	-3.86	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
5	2-Descarboxi-2,3-deshidro-betanina (2-descarboxi-xanbetanina)*	3.62	1.06	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1429	-4.75	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
6	17-Descarboxi-betanina	5.83	1.7	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1591	-3.55	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
7	Isoprebetanina	6.01	1.75	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₆ S	631.1076	631.1047	-4.6	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
8	Isobetanina	6.59	1.92	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1481	-4.9	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
9	2-Descarboxi-2,3-deshidro-isobetanina (2-descarboxi-isoxanbetanina)*	6.6	1.92	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1433	-3.96	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
10	2,17-Bidescarboxi-2,3-deshidro-betanina (2,17-bidescarboxi-xanbetanina)*	7.61	2.22	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461.1555	461.1534	-4.55	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
11	17-Descarboxi-isobetanina	7.69	2.24	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1587	-4.34	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Betaininas								
12	Phyllocactina	7.71	2.25	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₁₆	637.1512	637.1497	-2.35	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
13	17-Descarboxi-phyllocactina	8.01	2.34	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1591	-3.71	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
14	15-descarboxi-betanina	8.29	2.42	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1591	-3.55	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
15	Neobetainina	8.31	2.42	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₃	549.1351	549.1336	-2.73	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
16	17-Descarboxi-neobetainina*	8.39	2.45	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1438	-2.97	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
17	2-Descarboxi-neobetainina*	8.4	2.45	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1432	-4.16	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
18	Hylocerenina	8.39	2.45	C ₃₀ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	695.193	695.1899	-4.46	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
19	Lampranthin-I	8.41	2.45	C ₃₃ H ₃₂ N ₂ O ₁₅	697.1875	697.1861	-2.01	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
20	Isophyllocactina	8.46	2.47	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₁₆	637.1512	637.1491	-3.3	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
21	17-Descarboxi-hylocerenina*	8.72	2.54	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₅	651.2032	651.2012	-3.07	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
22	2-Descarboxi-betanina	8.83	2.57	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1596	-2.56	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
23	Isolampranthin-I	8.85	2.58	C ₃₃ H ₃₂ N ₂ O ₁₅	697.1875	697.1854	-3.01	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
24	Isohylocerenin	a8.88	2.59	C ₃₀ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	695.193	695.1909	-3.02	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
25	17-Descarboxi-isophyllocactina*	9.21	2.69	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1588	-4.21	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
26	17-Descarboxi-isohylocerenina*	9.26	2.7	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₅	651.2032	651.2009	-3.53	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Betaninas								
27	2-Descarboxy-phyllolactina	9.38	2.73	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1587	-4.38	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
28	2-Descarboxy-isophylloactina*	9.41	2.74	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1589	-4.05	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
29	2-Descarboxi-2,3-dehidro-neobetantina*	10.06	2.93	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₁₁	503.1296	503.1277	-3.78	341.07, 327.06, 313.08, 295.07, 277.07, 267.07, 253.06, 251.08, 221.07, 195.09, 132.04, 106.06
30	Neophylloactina*	10.13	2.95	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₁₆	635.1355	635.1327	-4.41	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
31	2,15,17-Tridescarboxi-neobetantina*	10.43	3.04	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₇	417.1656	417.1648	-1.92	417.17, 349.11, 271.09, 255.11, 159.04, 130.03
32	17-Descarboxi-neophylloactina*	10.52	3.07	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₁₄	591.1457	591.1432	-4.23	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
33	Neohylocerenina	10.89	3.17	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₁₇	693.1774	693.1758	-2.31	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
34	17-Descarboxi-neohylocerenina*	11.04	3.22	C ₂₉ H ₃₂ N ₂ O ₁₅	649.1875	649.1852	-3.54	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
35	2,17-Bidescarboxi-2,3-dehidro-neobetantina*	11.14	3.25	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₉	459.1398	459.1383	-3.27	297.08, 269.09, 251.08, 223.08, 195.09, 133.08
36	Lampranthin II	11.01	3.21	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1981	727.1956	-3.44	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
37	Isolampranthin II	11.34	3.31	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1981	727.1948	-4.54	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
38	2-Descarboxi-neohylocerenina	11.45	3.34	C ₂₉ H ₃₂ N ₂ O ₁₅	649.1875	649.1848	-4.16	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
39	2-Descarboxi-neophylloactina*	11.62	3.39	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₁₄	591.1457	591.1438	-3.21	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
40	Neolampranthin II	11.64	3.39	C ₃₄ H ₃₂ N ₂ O ₁₆	725.1825	725.1794	-4.27	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
41	Deshidro-tridescarboxi-neobetantina*	11.94	3.48	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₇	415.1499	415.1497	-0.48	415.14, 355.12, 347.09, 285.09, 185.04, 143.02

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Melocactinas								
42	Melocactina	4.81	1.4	C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	713.2036	713.2005	-4.35	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
43	Isomelocactina	7.18	2.09	C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	713.2036	713.2009	-3.79	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
Apiocactinas								
44	Apiocactina	7.21	2.1	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	683.193	683.1904	-3.81	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
45	Isoapiocactina	7.91	2.31	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	683.193	683.1911	-2.78	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
46	2'-O-Apiosil-phyllocactina*	8.31	2.42	C ₃₂ H ₃₆ N ₂ O ₂₀	769.1934	769.1912	-2.86	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
47	2'-O-Apiosil-isophyllocactina*	8.76	2.55	C ₃₂ H ₃₆ N ₂ O ₂₀	769.1934	769.1903	-4.03	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
48	17-Descarboxi-2'-O-apiosil-phyllocactina*	9.89	2.88	C ₃₁ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	725.2036	725.2011	-3.45	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
49	17-Descarboxi-2'-O-apiosil-isophyllocactina*	10.19	2.97	C ₃₁ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	725.2036	725.2007	-4.00	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
Gomphreninas								
50	Gomphrenina-I	4.06	1.18	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1481	-4.9	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
51	2-Descarboxy-2,3-dehidro-gomphrenina (2-descarboxi-xangomphrenina)*	6.71	1.96	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1431	-4.36	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Gomphreninas								
52	Isogomphrenina-I	6.87	2	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1486	-3.99	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
53	Neogomphrenina	8.58	2.5	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₃	549.1351	549.1327	-4.37	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
54	Gomphrenina-IV	10.91	3.18	C ₃₅ H ₃₆ N ₂ O ₁₇	757.2087	757.2065	-2.91	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
55	Isogomphrenina-IV	11.16	3.25	C ₃₅ H ₃₆ N ₂ O ₁₇	757.2087	757.2071	-2.11	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
56	Gomphrenina-III	11.33	3.3	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1981	727.1949	-4.4	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
57	Isogomphrenina-III	11.62	3.39	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1981	727.1957	-3.3	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
58	Neogomphrenina IV	11.59	3.38	C ₃₅ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	755.193	755.1914	-2.12	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
59	Neogomphrenina-III	11.92	3.48	C ₃₄ H ₃₂ N ₂ O ₁₆	725.1825	725.1798	-3.72	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
Glabraninas								
60	Glabranina	3.15	0.92	C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	713.2036	713.2015	-2.94	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
61	Coumglabranina*	10.59	3.09	C ₃₉ H ₄₂ N ₂ O ₂₀	859.2403	859.2377	-3.03	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
62	Isocoumglabranina*	10.85	3.16	C ₃₉ H ₄₂ N ₂ O ₂₀	859.2403	859.2371	-3.72	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
63	Neocoumglabranina*	11.29	3.29	C ₃₉ H ₄₀ N ₂ O ₂₀	857.2247	857.2208	-4.55	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Nuevas								
64	Nueva-1*	8.83	2.57	C ₃₅ H ₄₂ N ₂ O ₂₁	827.2353	827.2316	-4.47	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
65	Nueva-2*	9.23	2.69	C ₃₅ H ₄₂ N ₂ O ₂₁	827.2353	827.2328	-3.02	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
66	Nueva-3*	10.27	2.99	C ₃₄ H ₄₂ N ₂ O ₁₉	783.2455	783.2422	-4.21	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
67	Nueva-4*	10.54	3.07	C ₃₄ H ₄₂ N ₂ O ₁₉	783.2455	783.2428	-3.45	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Betaxantinas								
Con carga positive								
68	Histamina-bx*	9.04	2.64	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄	305.1244	305.1232	-3.93	287.12, 261.13, 256.89, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
Polares sin carga								
69	Glutamina-bx*	1.2	0.35	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	340.1139	340.1129	-2.94	323.08, 277.08, 249.08, 233.09, 231.07, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
70	Treonina-bx*	1.52	0.44	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₇	313.103	313.1022	-2.56	269.09, 267.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
71	Serina-bx*	4.77	1.39	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₇	299.0874	299.0861	-4.35	255.09, 253.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
Hidrofóbicas								
72	Glicina-bx*	6.49	1.89	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₆	269.0768	269.0758	-3.72	331.12, 239.11, 285.12, 283.10, 239.11, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
73	Metionina-bx*	7.3	2.13	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆ S	343.0958	343.0943	-4.37	315.09, 269.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
74	Valina-bx*	7.97	2.32	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	311.1238	311.1229	-2.89	267.13, 265.11, 237.12, 221.12, 219.11, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
75	Alanina-bx*	8.16	2.38	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆	283.0925	283.0915	-3.53	237.08, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
76	Prolina-bx*	9.02	2.63	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	309.1081	309.1068	-4.21	265.11, 263.10, 235.1, 219.11, 217.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
77	Isoleucina-bx*	9.87	2.88	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	325.1394	325.1384	-3.08	279.13, 251.13, 235.14, 233.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
78	Leucina-bx*	10.01	2.92	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	325.1394	325.1385	-2.77	281.14, 279.13, 251.13, 235.14, 233.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
79	Triptofano-bx*	10.12	2.95	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₆	398.1347	398.1331	-4.02	269.07, 223.07, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
80	Fenilalanina-bx*	10.15	2.96	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆	359.1238	359.1225	-3.62	315.13, 313.11, 269.12, 267.11, 223.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06

*Identificados tentativamente

Tabla 2 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Special case								
81	Ácido g-aminobutirico-bx*	2.82	0.82	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	297.1081	297.1069	-4.04	253.11, 251.10, 233.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
82	Dopamina-bx*	7.67	2.24	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347.1238	347.1226	-3.46	255.11, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
83	Tiramina-bx*	8.64	2.52	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₅	331.1288	331.1274	-4.23	287.13, 285.12, 239.11, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
84	3-Metoxi-tiramina-bx*	8.98	2.62	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₆	361.1394	361.1383	-3.05	315.13, 269.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
85	5-Hidroxinorvalina-bx*	9.89	2.88	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₇	327.1187	327.1179	-2.45	283.15, 237.15, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
86	Sulfóxido de metionina-bx*	10.09	2.94	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₇ S	359.0907	359.0893	-3.9	267.11, 223.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06

*Identificados tentativamente

2.4.4. Identificación de betalaínas desconocidas en el extracto de pitaya roja

Logramos identificar dos betalaínas desconocidas en la pitaya roja durante el análisis de los datos de espectrometría de masas. Estas betalaínas, referidas aquí como Nueva-1 y Nueva-2, no se encontraban en nuestra base de datos ni habían sido reportadas previamente, hasta donde la búsqueda de literatura exhaustiva lo reporta, mediante los siguientes parámetros de estricta coincidencia: caracterización por la fórmula molecular $C_{35}H_{42}N_2O_{21}$ y por los espectros obtenidos por MS/MS que contenían los iones distintivos de betalaínas con m/z 389.09, 345.10, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05 y 106.06. La betalaína Nueva-1 presentó un m/z de 827.2316 y eluyó a 8.83 min, mientras que la Nueva-2 tuvo un m/z de 827.2328 y eluyó a 9.23 min. Dado que las betalaínas pueden tener formas isoméricas, sospechamos que Nueva-1 es una forma isomérica de Nueva-2. Por lo que decidimos utilizar espectrometría de masas en múltiples etapas (MSn) con CID para revelar la identidad de las pérdidas neutras en las betalaínas desconocidas y compararlas con la fragmentación MS/MS con HCD (Figura 24). El espectro obtenido con HCD mostró los iones típicos de las betalaínas con m/z 389.09, 194.04, 150.05 y 106.06. Luego, al fragmentar el ion precursor con m/z 827.2316 mediante CID, se detectó una pérdida neutra de 134.0423 Da, correspondiente a un pentósido o ácido glutárico. Posteriormente, la fragmentación del ion producto con m/z 695.1930 mediante CID mostró una pérdida neutra de 162.0528 Da, coincidiendo con un glucósido. También, la fragmentación del ion producto con m/z 551.1508 reveló otra pérdida neutra de 162.0528 Da, correspondiente a un glucósido. Aunque estos datos proporcionan información sobre los grupos funcionales presentes en la estructura de las betalaínas desconocidas, se necesita más investigación para determinar completamente la estructura de Nueva-1 y Nueva-2. Finalmente, observamos que ambas betalaínas desconocidas presentaron formas descarboxiladas en el extracto, que eluyeron a 10.27 y 10.54 min con un m/z de 783.2455.

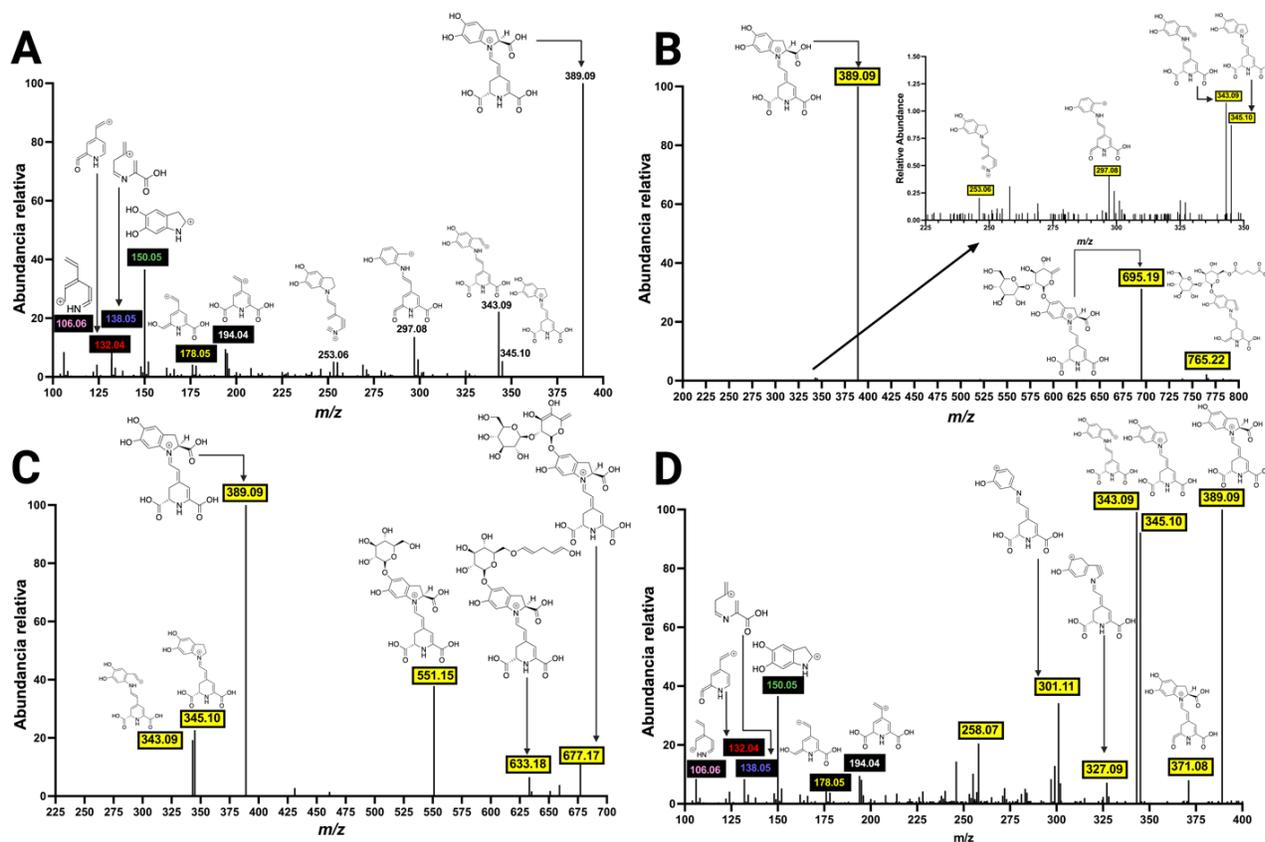


Figura 24. Espectros de masas de la betacianina Nueva-2. (A) Espectro MS/MS obtenido con fragmentación del ion m/z 827.23 con HCD. (B) Espectro MS/MS obtenido con el ion m/z 827.23 fragmentado con CID a 35 eV. (C) Espectro MS3 obtenido con el ion m/z 695.19 fragmentado con CID a 35 eV ($827.23 \text{ CID}35 \rightarrow 695.19 \text{ CID}35 \rightarrow$). (D) Espectro MS4 obtenido con fragmentación del ion m/z 551.15 con CID a 35 eV ($827.23 \text{ CID}35 \rightarrow 695.19 \text{ CID}35 \rightarrow 551.15 \text{ CID}35 \rightarrow$). Los iones conservados de las betalaínas están resaltados en negro (Araujo-León *et al.*, 2024b).

2.5. Conclusiones

En conclusión, nuestra base de datos de betalaínas y las huellas dactilares de espectrometría de masas de betanina, el análisis del extracto de betabel y el extracto de pitaya roja, fueron relevantes para evidenciar la fragmentación de betalaínas. Estos datos pueden ayudar a interpretar los espectros de masas de betalaínas, con ello se mejora la identificación de betalaínas, y además puede servir como base para la identificación de espectros de masas. Existen iones particulares para las betalaínas, como m/z 389 para betacianinas, m/z 345 para derivados de betalaína y m/z 343 para variantes de neobetanina, estos pueden utilizarse para la identificación rápida de betalaínas descarboxiladas y deshrogenadas. El ion con m/z 211.07 fue característico de las betaxantinas.

Se lograron identificar 86 betalaínas en el extracto de pitaya roja, este número de betalaínas es el más extenso que brinda datos experimentales reportado en la literatura, y que con el conjunto del análisis *in silico* permite que futuras investigaciones se beneficien en la identificación de betalaínas. Finalmente, se han reportado cuatro betalaínas desconocidas y se ha propuesto una ruta de fragmentación con base en una estructura química teórica. Para establecer con claridad las fórmulas y estructuras químicas de las betalaínas propuestas se requiere profundizar en la investigación con técnicas analíticas como RMN que permitan complementar esta información.

2.6. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este capítulo abren perspectivas prometedoras en diferentes áreas del conocimiento. En particular, en la industria alimentaria, química de alimentos y química analítica. En la industria alimentaria la demanda de pigmentos naturales está en constante aumento debido a la necesidad de reemplazar colorantes artificiales que pueden tener impactos negativos en la salud humana. Como ya sucedió con la reciente prohibición del colorante artificial rojo·3 (anunciada durante la conclusión de esta tesis) el 15 de enero de 2025 por la FDA por ser cancerígeno. Las metodologías experimentales y computacionales propuestas en este capítulo, que permiten la identificación y clasificación precisa de las betalaínas, brindan una herramienta invaluable para futuras investigaciones sobre estos pigmentos en diversos modelos de estudio de plantas. Para mejora de la investigación, se requiere una mayor automatización en estudios metabolómicos para optimizar la calidad de la identificación. Además, es importante continuar la investigación en nuevas matrices que permitan nutrir la base de datos generada y enriquecer y aumentar su volumen estudiando otras especies vegetales del orden Caryophyllales, por ejemplo, variedades de pitaya con colores distintos de pulpa y piel.

En perspectiva, los resultados y la metodología presentados en este capítulo abren un amplio abanico de posibles aplicaciones en la industria alimentaria, la química de los alimentos y la investigación en plantas. Estos hallazgos contribuyen al avance del conocimiento científico en la búsqueda de soluciones más saludables y sostenibles en el ámbito de los pigmentos naturales y su aplicación en diversas áreas de la ciencia y la tecnología, que favorezcan el desarrollo y la salud humana.

CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE BETALAÍNAS EN AMARANTO ROJO (*Amaranthus cruentus* L.) POR LC-MS

3.1. Resumen

Las betalaínas son pigmentos naturales responsables del color de las flores, brácteas, tallos y hojas del género *Amaranthus* y también son considerados compuestos bioactivos. Debido a su diversidad y complejidad química, la determinación e identificación con seguridad de estos compuestos sigue siendo un reto y desafío de gran interés, ya que dichos pigmentos presentan beneficios para la salud humana. En este capítulo analizamos, el perfil de betalaínas en amaranto rojo (*Amaranthus cruentus* L.), mediante cromatografía líquida de alta resolución (LC, por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) en tándem. Se lograron identificar 30 betacianinas y 13 betaxantinas mediante las mediciones del ion molecular y sus fragmentos, con un error menor a 5 ppm, con lo cual, se cumplen los criterios recomendados para la identificación de compuestos mediante MS de alta resolución. El objetivo de este capítulo fue definir las principales betalaínas en el “amaranto rojo” con la finalidad de valorizar la importancia de los pigmentos presentes en sus hojas e inflorescencias que hasta ahora no se han estudiado ni reportado como fuente natural de pigmentos betalaínicos.

3.2. Introducción

Las betalaínas son pigmentos naturales que están presentes en la mayoría de las familias del orden vegetal Caryophyllales (Stafford, 1994), hongos del género *Amanita* (Stintzing & Schliemann, 2007) y proteobacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Contreras-Llano *et al.*, 2019), y son responsables del color rojo violeta y amarillo anaranjado que se encuentra en flores, brácteas, frutos, tallos, hojas y raíces (Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021). El género *Amaranthus* pertenece a la familia *Amaranthaceae* y al orden Caryophyllales y al clado de eudicotiledóneas más grande con especies de rutas fotosintéticas basadas en C4. Este género consta de casi 75 especies que se encuentran en todo el mundo (Sauer, 1967; Kadereit *et al.*, 2003; Hernández-Ledesma *et al.*, 2015). En el México prehispánico, el amaranto era sagrado y comido por los aztecas (Sauer, 1967). Además, evidencias arqueobotánicas ha demostrado que el examen de semillas e inflorescencias de amaranto encontrado en la cueva de Coxcatlán en Puebla, México, ha revelado que *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Amaranthus cruentus* L. fueron cosechados durante miles de años (Sauer, 1969). A pesar de la diversidad genética entre el gran número de

especies del género *Amaranthus*, *A. hypochondriacus* es el principal amaranto cultivado en México en la actualidad.

Estudios recientes han demostrado que el amaranto posee un alto contenido en proteína, minerales esenciales como hierro, calcio, magnesio, fósforo y potasio, y ácidos grasos insaturados que superan a otros cereales como el trigo, el maíz o el arroz, estos hallazgos hicieron esencial el poder introducir al amaranto y sus productos derivados en el mercado (Joshi *et al.*, 2018; Szabóová *et al.*, 2020). Además, actualmente en México el amaranto es utilizado como alimento tradicional, un ejemplo es la "alegría", la cual es un dulce de semillas de amaranto reventado. Existe una variedad de productos alimenticios de consumo que incluyen cereales para el desayuno, productos horneados, y pigmentos de betalaínas (Schnetzler, 1994). Por lo tanto, la caracterización molecular de las especies de amaranto puede facilitar el cultivo de amaranto para satisfacer la creciente demanda de amaranto y sus derivados por parte de los consumidores.

La betanina es una betalaína del grupo de las betacianinas, la cual, fue aislada por primera vez de la "remolacha roja" (*Beta vulgaris* L.) en 1918 por Schudel (Pucher *et al.*, 1938) y aprobada como colorante alimentario natural con el código E162 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Asimismo, las betalaínas de amaranto también fueron aprobadas como colorantes alimentarios naturales en China (Norma nacional de seguridad alimentaria para uso de aditivos alimentarios, GB2760-2011). Las betalaínas se dividen en dos grupos, las betacianinas y las betaxantinas. Las betacianinas rojo-violeta son una variedad de compuestos que aparecen como ácido betalámico condensado con ciclo-DOPA o ciclo-DOPA glicosilada que puede poseer grupos glucosilo o glucuronosilo agregados o someterse a acilación en los hidroxilos de las azúcares, también pueden presentar reacciones de descarboxilación y deshidrogenación, mientras que las betaxantinas de color amarillo anaranjado son compuestos con esqueletos que se basan en el andamio del ácido betalámico condensado con un grupo imino o amino de aminoácidos (Khan & Giridhar, 2015; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021).

Las betacianinas se han organizado en al menos siete grupos distintivos que difieren en la unión de los grupos glucosilo a los átomos de oxígeno en la posición orto en el resto ciclo-DOPA, así como en la posición de los restos de enlace glucosilo o glucuronosilo (Belhadj Slimen *et al.*, 2017; Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021): tipo betanina, tipo gomphrenina, tipo amarantina, tipo melocactina (tipo *Bougainvillea-r-l*), tipo oleracina, tipo apiocactina y tipo glabranina (tipo *Bougainvillea-v*) (Figura 25). La amarantina es la principal betacianina del género *Amaranthus*.

Además del uso de las betacianinas como pigmentos, se han reportado que poseen actividades biológicas, como actividades antiinflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladoras y propiedades quimioprotectoras contra el cáncer (Tang & Tsao, 2017; Fu *et al.*, 2020).

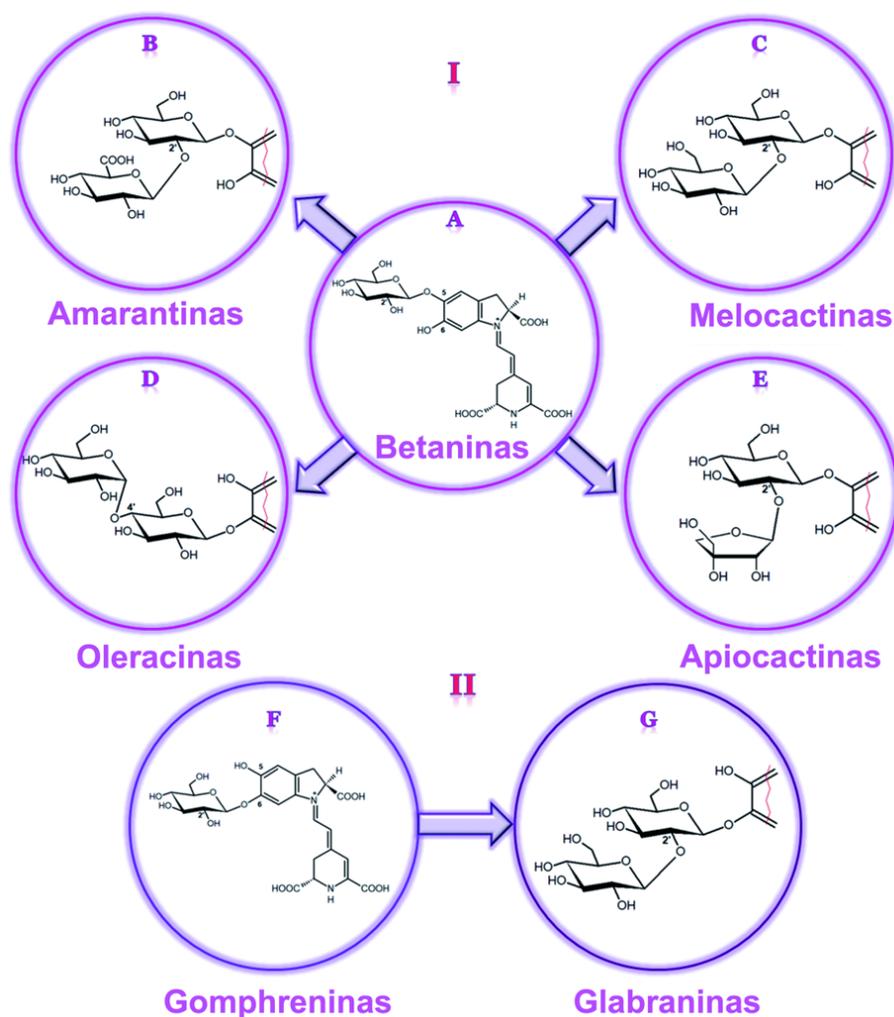


Figura 25. Clasificación integral de los pigmentos de betacianinas (Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021).

La mayoría de los esfuerzos para la cuantificación de betacianinas y betaxantinas se ha centrado mediante análisis espectrométrico multicomponente en extractos crudos, los cuales posiblemente posean sustancias interferentes (Khan, 2016). Una de las desventajas del uso de métodos espectrofotométricos es que múltiples betacianinas y betaxantinas están presentes en las muestras de tejido vegetal, y la concentración de betalainas únicamente es basada en los

coeficientes de extinción molar de betanina para las betacianinas, y para las betaxantinas en vulgaxantina-I (Cai *et al.*, 1998). La cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) se ha simplificado para estudiar diferentes betacianinas y betaxantinas, y la LC junto con MS en tándem ha sido la técnica líder ya que puede registrar el valor m/z del ion molecular o los aductos y los fragmentos de la molécula para distinguir entre diferentes betacianinas y betaxantinas y sus derivados. En este capítulo se expone el uso de LC-MS/MS con el método propuesto en el capítulo II para definir la composición de betalaína en “amaranto rojo” (*A. cruentus*) para valorizar las hojas e inflorescencias como fuente de pigmentos del tipo betalaínas.

3.3. Metodología

3.3.1. Material vegetal

Ejemplares botánicos de *A. cruentus* fueron colectados en Valladolid, Yucatán, México. Éstos fueron identificados por la Dra. Ivonne Sánchez del Pino. Las plantas de *A. cruentus* se cultivaron en el jardín e invernaderos experimentales del CICY en exterior. Las hojas e inflorescencias fueron colectadas de las plantas con 60 días de cultivo. Los tejidos obtenidos se colectaron en campo e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se secaron en frío por liofilización a $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. Finalmente, los tejidos fueron triturados con un molino de cuchillas y se almacenaron en obscuridad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de sus análisis.

3.3.2. Reactivos químicos

Se utilizó como disolventes de extracción metanol (MeOH) y agua (H_2O) grado HPLC de la marca Tedia (Fairfield, USA). Para el análisis por LC-MS se utilizó MeOH y H_2O grado LC-MS de la marca Tedia (Fairfield, USA), la fase móvil fue acidulada con ácido acético de grado LC-MS de la marca Fisher Scientific (Waltham, USA). Como material de referencia se utilizó un extracto de remolacha roja de Sigma-Aldrich (Cat. # 901266, St. Louis, MO, USA). Para la extracción por MSPD se utilizó como fase estacionaria BondElut-C18 que se adquirió de la marca Agilent Technologies con tamaño de partícula de $40\text{ }\mu\text{m}$ (Santa Clara, CA, USA).

3.3.3. Extracción de las betalainas de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus*

Las betalainas se extrajeron por MSPD como se ha propuesto en el capítulo II. Se utilizó 100 mg de tejido y se molieron a temperatura ambiente con 400 mg de fase estacionaria en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. La mezcla sólida obtenida se colocó en cartuchos para Extracción en Fase Sólida (SPE, por sus siglas en inglés) y con ayuda de un Viciprep para extracción a vacío a -15 mmHg se eluyeron con 9 mL de H₂O acidulada al 0.1% con ácido acético y posteriormente se eluyó con una mezcla de MeOH:H₂O (1:1, v/v) acidulada al 0.1% con el mismo ácido. Ambos eluyentes se colectaron y se evaporaron hasta sequedad. El extracto obtenido se resuspendió en H₂O acidulada al 0.1% con ácido acético y se transfirió a un vial ámbar de grado MS para el análisis por LC-MS.

3.3.4. Análisis por LC-MS con analizador LTQ-Orbitrap

El análisis por LC-MS Orbitrap se realizó utilizando un equipo Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado a un detector UV/Vis (Ultimate 3000 UV/VIS detector, Dionex), y a un detector de masas LTQ-Orbitrap Elite espectrómetro (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) equipado con una interfaz de ionización por electrospray (HESI-II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se inyectó una alícuota de 20 µL de la muestra, se transfirió a un *loop* de acero inoxidable y luego a una columna Hypersil Gold C18 (100 × 2.1 mm, tamaño de partícula de 1.9 µm) a un caudal de 300 µL/min. La muestra se eluyó de la columna a un caudal de 300 µL/min utilizando un gradiente binario compuesto por H₂O acidulada con ácido acético al 0.1% (disolvente A) y MeOH acidulado con ácido acético al 0.1% (disolvente B). Los ajustes del gradiente fueron los siguientes: 0-30 min del 5 al 100%, isocrático durante 10 min, luego volviendo al 5% e isocrático durante 10 min para el reacondicionamiento de la columna. Los datos de los espectros UV/Vis se colectaron a 480 y 540 nm. Los datos de los espectros de MS se adquirieron en modo positivo: resolución MS1 60,000, intervalo de exploración de 100-1500 *m/z*; MS2 resolución de 60,000, rango de escaneo de 100-600 *m/z*. La disociación por colisión de mayor energía (HCD) se utilizó como método de fragmentación mediante la aplicación de 50 eV. Las áreas de pico de cada compuesto basadas en el modo MS1 utilizando los cromatogramas de iones extraídos se determinaron con el software Xcalibur 4.1 (Thermo Scientific, USA). Los gráficos se obtuvieron utilizando GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Determinación de betalaínas en el material de referencia de remolacha roja

Debido a la falta de estándares analíticos de betalaínas, utilizamos el material de referencia de Sigma-Aldrich de extracto de remolacha roja para identificar con precisión los picos cromatográficos de betanina y con base en su tiempo de retención y datos espectrométricos comprender el posible comportamiento de otras betalaínas. El cromatograma obtenido a 540 nm con el detector UV/Vis mostró dos picos de alta absorción con tiempos de retención de 3.93 y 6.76 min, respectivamente (Figura 26-A). Ambos picos se encuentran separados con una resolución mayor a 1.5 con respecto a la línea base y mostraron un ion del aducto $[M+H]^+$ con una m/z 551.1482, lo cual era esperado para los epímeros de betanina. Además, los espectros en MS2 con una colisión por HCD a 50 eV son similares. Los dos picos produjeron el ion MS2 m/z 389.09, lo que sugiere la presencia de hexósido (Figuras 26-B y 26-C). En las betalaínas de tipo betanina, el glucósido se une a través del oxígeno del carbono C-5 (Xie & Chen 2021). La isobetanina es el epímero de la betanina en el centro quiral de C-15, y se ha informado un mayor valor de tiempo de retención (t_R) para la isobetanina que para la betanina que se explica en cierta medida por una isobetanina ligeramente menos polar que la betanina según la estimación del momento dipolar (Stintzing & Carle, 2004; Schwartz & von Elbe, 1980). La separación de la línea base de los dos picos y los datos de los espectros MS1 y MS2 conducen a una identificación segura de betanina e isobetanina.

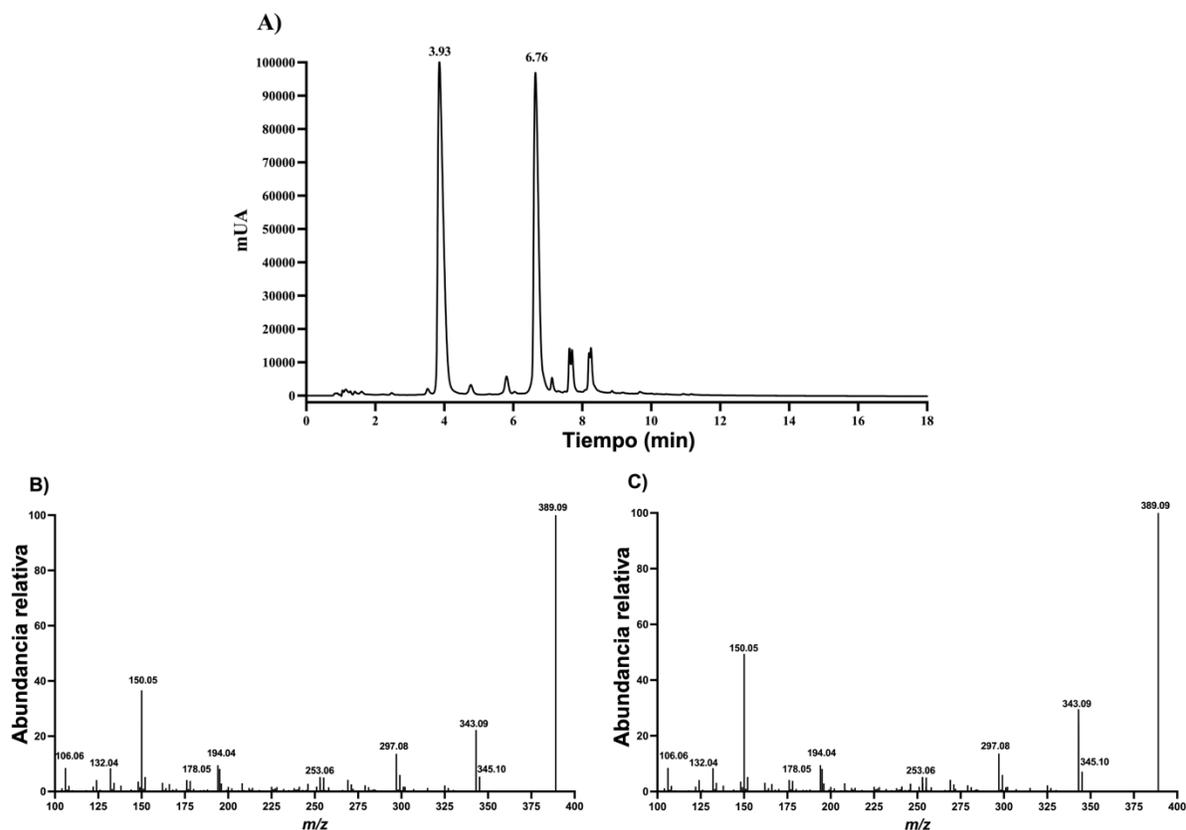


Figura 26. Análisis por LC-MS del material de referencia de remolacha roja. A) Cromatograma a 540 nm. Espectros MS2 obtenido a 50 eV en HCD del B) pico a 3.93 min (betanina) y C) pico a 6.76 min (isobetanina) (Araujo-León *et al.*, 2023b).

3.4.2. Identificación y cuantificación relativa de 43 betalaínas por LC-MS

Para la identificación y cuantificación relativa de las betalaínas presentes en los tejidos de “amaranto rojo”, usamos betanina como referencia para establecer los tiempos de retención relativos, graficando los cromatogramas con la absorbancia a 540 nm acoplado con análisis LC-MS. La accesión de *A. cruentus* que estudiamos era un fenotipo con hojas e inflorescencias rojas (Figura 27). También se usó como referencia un catálogo de betalaínas que consta de 68 betalaínas separadas cromatográficamente e identificadas con confianza por Xie y Chen (2021) (Gonçalves *et al.*, 2012) de cultivares de *Chenopodium formosanum*, ya que en este trabajo también se usó una columna C18. En general, la altura de los picos de absorción en las hojas fue menor que en el par de picos en las inflorescencias, y los picos de absorción más altos coincidieron con los picos 1 y 2, que son los compuestos principales en ambos cromatogramas, correspondientes a amarantina e isoamarantina (Figuras 28A y 28B). El ion $[M+H]^+$ a m/z 727.1803 y los iones MS2 después de ser fragmentados a 50 eV en HCD que observamos en

las Figuras 28C y 28D fueron similares a los datos de la literatura para amarantina aislada de tallos e inflorescencias de plantas de Amaranthaceae incluyendo el género *Amaranthus* (Cai *et al.*, 2001; Xie & Chen, 2021; Howard *et al.*, 2022), en los pétalos de *Gomphrena globosa* (Kugler *et al.*, 2007) e inflorescencias de *Celosia argentea* var. *cristata* y *Celosia argentea* var. *plumosa* (Schliemann *et al.*, 2001). La amarantina e isoamarantina presentaron menor retención relativa con respecto a la betanina, lo cual concuerda con los datos reportados anteriormente (Cai *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2012). El hecho de que el valor de t_R de la amarantina sea menor que el de la betanina puede explicarse por el ácido glucurónico adherido al resto de glucosa. En las betalaínas de tipo amarantina, el ácido glucurónico se une a través del oxígeno en el carbono C-2 de la fracción de glucosa.



Figura 27. *Amaranthus cruentus* L., accesión “amaranto rojo” (Araujo-León *et al.*, 2023b).

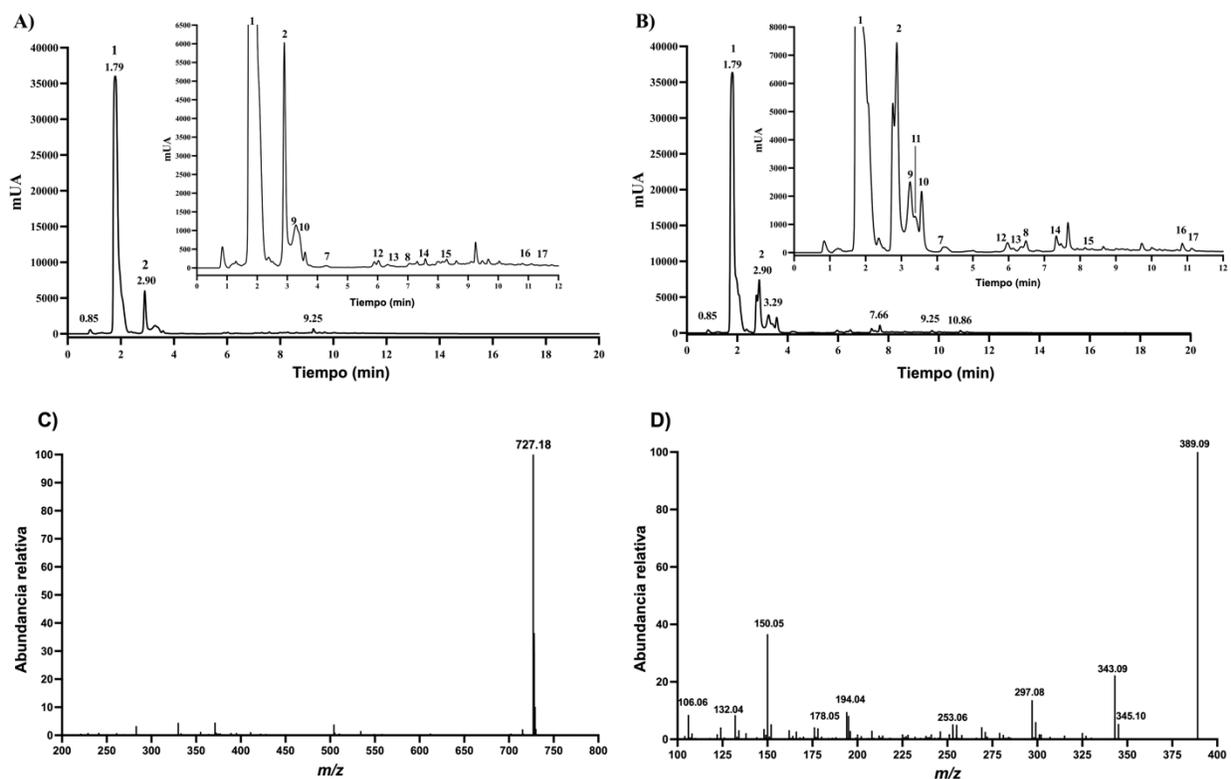


Figura 28. Análisis por LC-MS de muestras de “amaranto rojo”. A) Cromatograma a 540 nm de hojas y B) inflorescencias. C) Espectros de MS1 obtenidos para el primer pico. D) Espectro de MS2 obtenido para el segundo pico con una colisión a 50 eV por HCD (Araujo-León *et al.*, 2023b).

De acuerdo con la precisión de la medición de masa en Orbitrap Elite, se identificaron 43 betalainas con errores de medición de masa menores a 5 ppm (Tabla 3). Los datos obtenidos en el espectro MS2 se usaron para confirmar la identificación precisa de betanina en muestras de amaranto y para comparar con los datos de espectros MS2 informados previamente para muestras de cultivares de *Chenopodium formosanum* (Gonçalves *et al.*, 2012), especies de *Melocactus* (Sutor & Wybraniec, 2020), cultivares de *Beta vulgaris* (Slatnar *et al.*, 2015; Kusznierevicz *et al.*, 2021), y especies de *Amaranthus* (Cai *et al.*, 2001). Entre las betalainas en las muestras de amaranto rojo se detectaron seis de tipo amarantina, dos de tipo gomphrenina, 22 de tipo betanina y 13 betaxantinas. El tipo amarantina incluye amarantina, isoamarantina, que es el epímero de amarantina, y derivados de amarantina. El tipo gomphrenina incluye gomphrenina-I y su epímero. Los de tipo betanina incluyen prebetatina, betanina, betanidina, isobetanina, phyllocatina, isophyllocactina, lamprantina II, isolamprantina II y derivados de betanina (Figura 29). Se ha reportado que las reacciones de descarboxilación y la oxidación de

betacianinas producen derivados de betacianina, generalmente generados por altas temperaturas (Wybraniec, 2005; Kumorkiewicz & Wybraniec, 2017). Al comparar los derivados de betacianina, encontramos un número menor de derivados de amarantina que de derivados de betanina. Las betaxantinas que se identificaron en el amaranto rojo incluyen betaxantinas derivadas de aminas, por ejemplo, histamina, tiramina y dopamina betaxantinas. Betaxantinas derivadas de aminoácidos no polares, por ejemplo, triptofano, fenilalanina, leucina, alanina y prolina-betaxantina, y betaxantinas derivadas de aminoácidos polares como serina, treonina y glutamina-betaxantina también fueron identificadas.

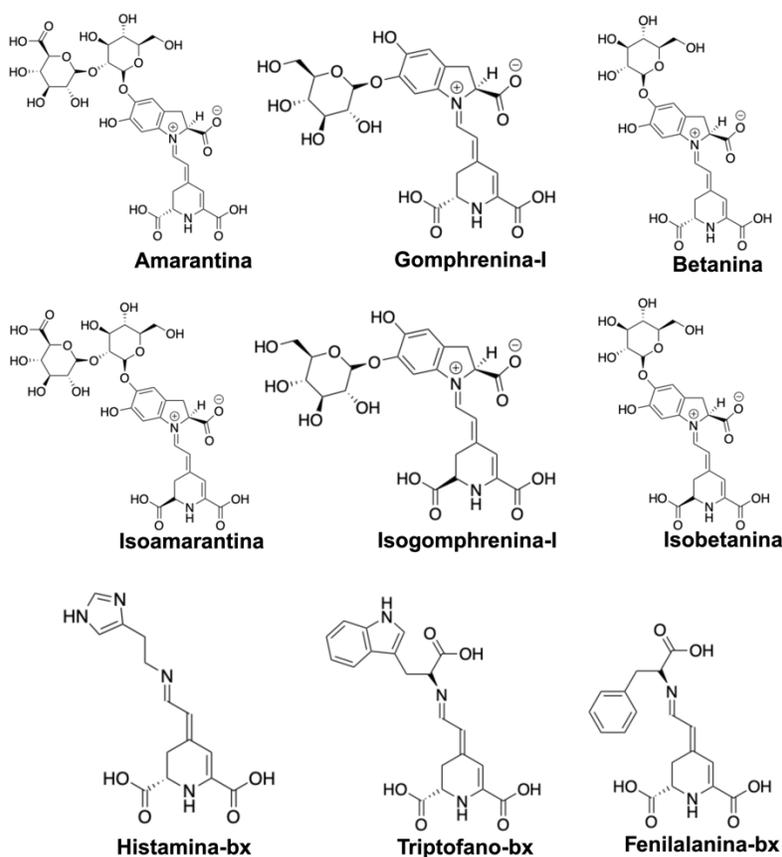


Figura 29. Estructuras químicas de las principales betalainas encontradas en el "amaranto rojo" (*Amaranthus cruentus* L.) (Araujo-León *et al.*, 2023b).

Tabla 3. Datos cromatográficos y espectrométricas de las betalainas en “amaranto rojo”.

#	Compuesto	Tiempo de retención (Tr)	Tr relativo	Formula Química	m/z [M+H] ⁺ teórico	m/z [M+H] ⁺ observado	Error	Fragmentos
Amarantinas								
1	Amarantina	1.85	0.53	C ₃₀ H ₃₄ N ₂ O ₁₉	727.1826	727.1843	-2.3	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
2	Isoamarantina	2.70	0.78	C ₃₀ H ₃₄ N ₂ O ₁₉	727.1826	727.1841	-2.0	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
3	17-Descarboxi-amarantina	3.07	0.89	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	683.1930	683.1922	1.2	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
4	17-Descarboxi-isoamarantina	6.05	1.76	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	683.1930	683.1920	1.5	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
5	Descarboxi-isoamarantina	7.68	2.23	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₁₇	683.1930	683.1925	0.8	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
6	Neoamarantina	7.25	2.11	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₁₉	725.1672	725.1641	4.3	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
Gomphreninas								
7	Gomphrenina-I	4.06	1.18	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1526	-3.26	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
8	Isogomphrenina-I	6.87	2.00	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1527	-3.53	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
Betaninas								
9	Prebetanina	3.19	0.93	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₆ S	630.1003	630.1030	-4.24	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
10	Betanina	3.93	1.00	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1522	-2.51	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
11	Betanidina	3.44	1.00	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₈	389.0979	389.0994	-3.77	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
12	Isoprebetanina	6.01	1.75	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₆ S	630.1003	630.1018	-2.39	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
13	Isobetanina	6.76	1.92	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1523	-2.69	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
14	Phyllocactina	7.71	2.25	C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₆	638.1596	638.1610	-2.17	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
15	Isophyllocactina	8.46	2.47	C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₆	638.1596	638.1610	-2.23	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
16	Lampranthin II	11.00	3.21	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1989	727.2020	-4.31	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05

Tabla 3 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención (Tr)	Tr relativo	Formula Química	m/z [M+H] ⁺ teórico	m/z [M+H] ⁺ observado	Error	Fragmentos
Betaninas								
17	Isolampranthina II	11.34	3.31	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1989	727.2020	-4.29	389.09, 343.09, 297.08, 194.04, 150.05
18	17-Descarboxi-betanina	5.83	1.70	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1627	-3.52	345.10, 299.10, 194.04, 150.05, 106.06
19	17-Descarboxi-isobetanina	7.69	2.24	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1620	-2.24	345.10, 299.10, 194.04, 150.05, 106.06
20	15-Descarboxi-betanina	8.29	2.42	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1627	-3.57	345.10, 299.10, 194.04, 150.05, 106.06
21	2-Descarboxi-phyllactina	9.21	2.69	C ₂₆ H ₂₉ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1634	-3.51	345.10, 299.10, 194.04, 150.05, 106.06
22	2-Descarboxi-isophyllactina	9.41	2.74	C ₂₆ H ₂₉ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1627	-2.43	345.10, 299.10, 194.04, 150.05, 106.06
23	17-Descarboxi-neobetanina	3.62	1.06	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1470	-3.31	343.09, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
24	Neobetanina descarboxilada	6.6	1.92	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1472	-3.83	343.09, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
25	2-Descarboxi-neobetanina	6.71	1.96	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1469	-3.24	343.09, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
26	Bidescarboxi-deshidro-betanina	7.61	2.22	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461.1555	461.1577	-4.71	299.10, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
27	Neobetanina	8.31	2.42	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₃	549.1351	549.1376	-4.50	387.07, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
28	2-Descarboxi-isonobetanina	8.39	2.45	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1478	-4.90	343.09, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
29	2-Descarboxi-2,3-Deshidro-neobetanina	10.06	2.93	C ₂₃ H ₂₃ N ₂ O ₁₁	503.1296	503.1309	-2.50	341.07, 297.08, 194.04, 150.05, 106.06
30	Bidescarboxi-2,3-deshidro-neobetanina	11.14	3.25	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₉	459.1398	459.1418	-4.41	297.08, 269.09, 251.08, 223.08, 195.09

Tabla 3 (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención (Tr)	Tr relativo	Formula Química	m/z [M+H] ⁺ teórico	m/z [M+H] ⁺ observado	Error	Fragmentos
<i>Betaxanthins</i>								
31	Histamina-bx	9.04	2.64	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄	305.1244	305.1255	-3.76	287.12, 261.13, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
32	Triptofano-bx	10.12	2.95	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₆	398.1340	398.1349	-2.19	269.07, 223.07, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
33	Fenilalanina-bx	10.15	2.96	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆	359.1230	359.1241	-3.15	315.13, 313.11, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
34	Leucina-bx (Vulgaxanthina IV)	10.01	2.92	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	325.1387	325.1395	-2.56	281.14, 251.13, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
35	Alanina-bx	2.02	0.59	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆	283.0920	283.0929	-3.30	237.08, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
36	Prolina-bx (Indicaxanthina)	3.04	0.89	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	309.1075	309.1084	-2.82	265.11, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
37	Serina-bx	4.77	1.39	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₇	299.0869	299.0880	-3.84	255.09, 253.09, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
38	Treonina-bx	1.52	0.44	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₇	313.1022	313.1028	-1.83	269.09, 267.09, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
39	Glutamina-bx (Vulgaxanthina I)	1.20	0.35	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	340.1134	340.1145	-3.20	323.08, 277.08, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
40	Glicina-bx (Portulacaxanthina II)	6.49	1.89	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₆	269.0756	269.0761	-1.78	331.12, 239.11, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
41	Metionina-bx	7.30	2.13	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆ S	343.095	343.0962	-3.36	315.09, 269.09, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
42	Tiramina-bx (Miraxanthina III)	8.64	2.52	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₅	331.1281	331.1295	-4.21	287.13, 239.11, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06
43	Dopamina-bx (Miraxanthina V)	7.67	2.24	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347.123	347.1236	-1.75	255.11, 211.07, 194.04, 150.05, 106.06

Para determinar las betalaínas más abundantes en el “amaranto rojo”, se realizó una cuantificación relativa debido a que no se disponía de estándares analíticos comerciales para betalaínas. Se midieron las áreas de los picos de cada betalaína en el modo MS1 usando los cromatogramas de iones extraídos basados en el ion precursor $[M+H]^+$ y se transformaron en \log_{10} (Figura 30). En el mapa de calor destacan las betacianinas y betaxantinas más abundantes (cuanto más oscuro es el color, mayor es la concentración). La amarantina, la cual se identificó como la betacianina con mayor abundancia en las muestras de “amaranto rojo”, concuerda con estudios previos (Xie & Chen, 2021; Howard *et al.*, 2022; Sarker *et al.*, 2022). La amarantina fue cuatro veces más abundante en las inflorescencias que en las hojas y fue casi el 70% de la composición de betacianina. También se detectó isoamarantina, que es el epímero de la amarantina, pero es menos abundante en comparación con la amarantina, tanto en las inflorescencias como en las hojas del “amaranto rojo”. La amarantina y su epímero isoamarantina se reportaron como betacianinas abundantes y ampliamente distribuidas en treinta y siete especies de ocho géneros de Amaranthaceae (Cai *et al.*, 2001). Entre las cuarenta accesiones estudiadas por Cai *et al.* (2001), amarantina e isoamarantina se presentaron hasta en 91.5 y 2.8% en promedio de la composición de betacianina, respectivamente. La abundancia de derivados de amarantina fue mayor que la de derivados de betanina; encontramos tres y diez veces más derivados de amarantina que derivados de betanina en inflorescencias que en hojas, respectivamente. Este hallazgo concuerda con el hecho de que los derivados de betacianina se generaron espontáneamente a partir de betacianinas, por lo que una mayor abundancia de amarantina que de betanina puede resultar en una mayor abundancia de 17-descarboxi-amarantina, descarboxi-isoamarantina y neo-amarantina que de derivados de betanina. Las principales betaxantinas en las hojas e inflorescencias del amaranto rojo fueron histamina-betaxantina, betaxantinas derivadas de aminoácidos no polares (triptofano-, fenilalanina-, leucina-, alanina-, prolina-betaxantina) y betaxantinas derivadas de aminoácidos polares (serina-, treonina-, glutamina-betaxantina), que forman aproximadamente el 90% de la composición de las betaxantinas. Una comparación de la abundancia de las betaxantinas individuales reveló que había una mayor abundancia en las hojas que en las inflorescencias. Estos hallazgos sugieren que tanto las betacianinas como las betaxantinas se pueden producir en el “amaranto rojo”.

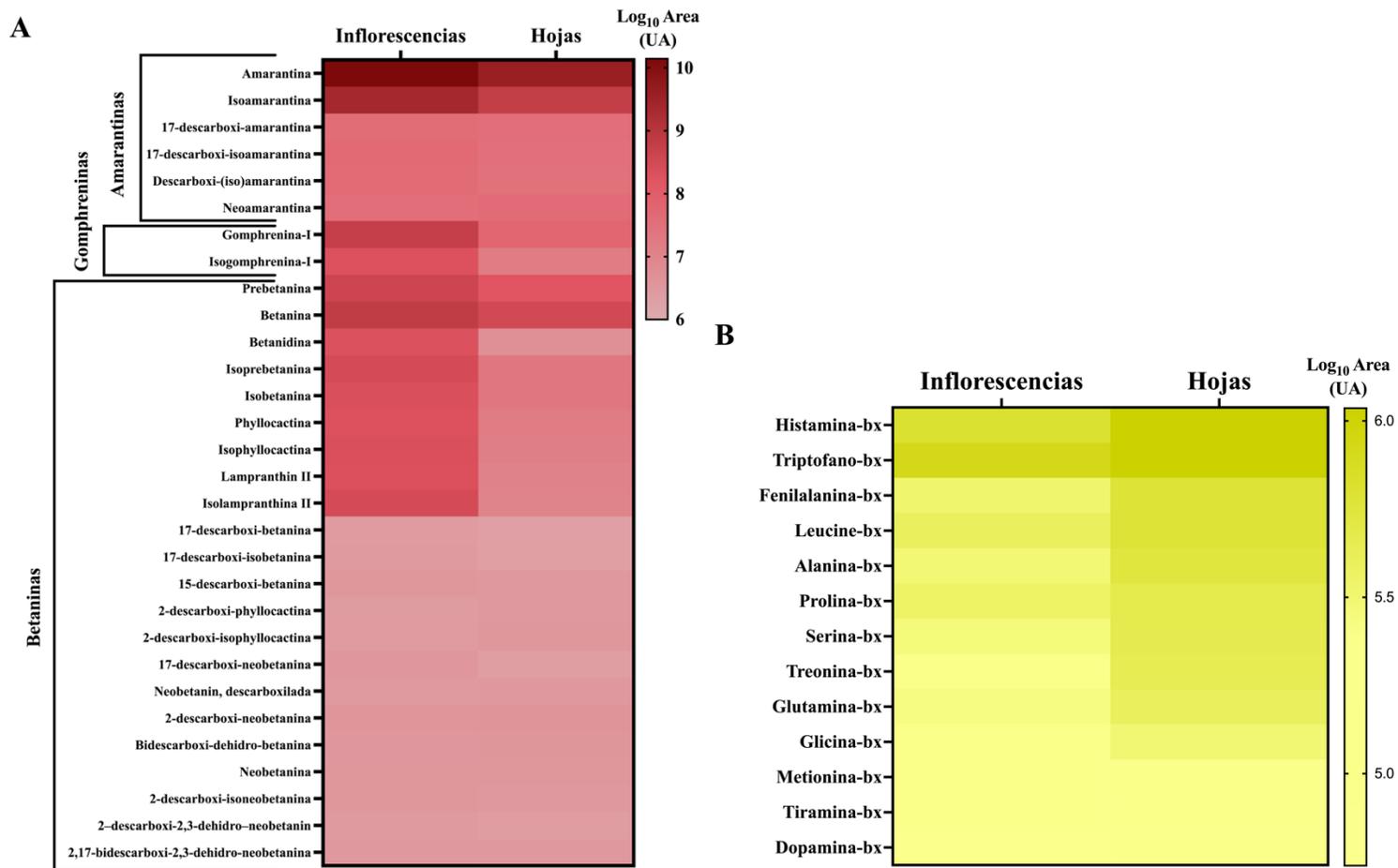


Figura 30. Abundancias relativas de las principales betalainas observadas en “amaranto rojo”. A) betacianinas y B) betaxantinas determinadas bajo una transformación \log_{10} del área de los picos (Araujo-León *et al.*, 2023b).

Dado que la accesión de amaranto utilizado en este estudio era de color rojo en todos los tejidos, incluidos los tallos, las hojas y las inflorescencias, podría sugerir que la ruta de las betacianinas es favorecida, sin embargo, los resultados demuestran la presencia de betacianinas y las betaxantinas, lo cual implica que el “amaranto rojo” posee la capacidad de sintetizar ambas betalaínas respaldado por su vía biosintética. Se han realizado estudios centrados en mejorar la producción de betalaínas en plantas que han revelado el uso de L-tirosina y genes clave responsables de la sobreacumulación de betacianinas y betaxantinas (Wang *et al.*, 2017; Polturak & Aharoni, 2018). Las betalaínas se sintetizan a partir de L-tirosina que se hidroxila a L-DOPA por un grupo de tirosina hidroxilasas redundantes (CYP76AD1/5/6/15). El L-DOPA se convierte en 4,5-seco-DOPA mediante la L-DOPA 4,5-dioxigenasa (DODA), y luego en ácido betalámico después de que se produzca una condensación intramolecular espontánea para la formación de la especie química 4,5-seco-DOPA (Polturak & Aharoni, 2018; Timoneda *et al.*, 2019). L-DOPA se puede oxidar paralelamente a ciclo-DOPA por CYP76AD1/3. Cuando el ácido betalámico se conjuga con ciclo-DOPA, se generan betacianinas de color rojo violeta, mientras que la conjugación con el grupo de aminoácidos imino o amino genera betaxantinas amarillas. Wang *et al.* (2017) utilizaron variedades de remolacha roja que se caracteriza por producir un alto rendimiento de betacianinas y variedades de remolacha amarilla que producen un alto rendimiento de betaxantinas, encontraron que la acumulación de betacianinas necesita una alta concentración de L-tirosina, mientras que las betaxantinas requieren una reducción para convertir L-DOPA en ciclo-DOPA. Como la mayor parte de la investigación sobre el amaranto se ha centrado en los valores de los nutrientes, nuestro análisis LC-MS de las hojas y las inflorescencias permitió la caracterización de las 43 betalaínas en el amaranto rojo. Estos datos amplían la información sobre el contenido de betalaína en *A. cruentus* que hasta ahora sólo ha sido obtenida con técnicas espectrofotométricas (Khan, 2016). Esta información ayudará a comprender los pigmentos que recientemente se han generado para nuevos productos y tecnologías basados en el uso de *A. cruentus* (Avila-Nava *et al.*, 2022; Coelho *et al.*, 2022)

3.5. Conclusiones

En este capítulo, nuestros resultados delimitan las principales betalaínas en hojas e inflorescencias de “amaranto rojo” (*A. cruentus*). Además, es el primer reporte en la literatura para esta especie. Consta de seis betacianinas de tipo amarantina, dos betacianinas de tipo gomphrenina, 22 betacianinas de tipo betanina y 13 de betaxantinas. La identificación por LC-MS de alta resolución permitió identificar las betalaínas con errores de medición de masa de

menos de 5 ppm; también fue posible identificar a los derivados de betacianinas procedentes de reacciones de descarboxilación y oxidación. La composición de betalaínas en “amaranto rojo” y la estrategia metodológica que se ha propuesto en este trabajo brindan una plataforma analítica para la espectrometría de masas en alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés), proporcionando el ion molecular [M+H] y los fragmentos de MS/MS, que pueden permitir en el futuro la caracterización de betalaínas en otras especies de amaranto o especies productoras de betalaínas de la familia Amaranthaceae y el orden Caryophyllales.

3.6. Perspectivas

La determinación del perfil de betalaínas en la accesión roja de *A. cruentus* no sólo proporciona información valiosa sobre estos metabolitos en esa accesión en particular, sino que también proporciona las bases para investigar la presencia de betalaínas en otras especies o accesiones de amaranto. Los avances en la comprensión del perfil de betalaínas en diversas especies de amaranto abren perspectivas prometedoras en la industria alimentaria. Por un lado, se pueden explorar nuevas fuentes de pigmentos naturales para su uso como alternativas a los colorantes artificiales en la industria alimentaria. Esto contribuiría a satisfacer la creciente demanda de pigmentos naturales y a promover alimentos más saludables y sostenibles. Además, comprender y estudiar el perfil de betalaínas en amarantos impulsará nuestra investigación en el desarrollo de alimentos funcionales, debido a las propiedades benéficas para la salud humana que este grupo de metabolitos especializados presenta como posibles auxiliares en el manejo, atención y prevención de la diabetes e hipertensión, enfermedades de atención regional, nacional e internacional.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS METABOLÓMICO POR HPLC PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS E INFLORESCENCIAS DE *Amaranthus cruentus* L. Y SU POTENCIAL ANTIDIABÉTICO Y ANTIHIPERTENSIVO

4.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue investigar el potencial de los flavonoides (quercetina, kaempferol, catequina, hesperetina, naringenina, hesperidina y naringina) de *Amaranthus cruentus*, derivados del ácido cinámico (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico) y ácidos benzoicos (ácido vainílico y ácido 4-hidroxibenzoico) como agentes antioxidantes, antidiabéticos y antihipertensivos. Se desarrolló un método analítico con HPLC-UV-DAD para la cuantificación simultánea de flavonoides, derivados del ácido cinámico y ácidos benzoicos para el análisis metabolómico de hojas e inflorescencias de *A. cruentus*. La validación del método analítico se realizó evaluando la linealidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la precisión y la recuperación. En las hojas se encontraron los mayores contenidos de flavonoides totales (5.2 mg/g de material liofilizado) y de derivados del ácido cinámico (0.6 mg/g de material liofilizado). Utilizando espectrofotometría UV-Vis, se detectaron los máximos contenidos de betacianinas totales (74.4 mg/g de material liofilizado) y betaxantinas (31 mg/g de material liofilizado) en las inflorescencias. El extracto de hoja demostró la mayor actividad en la eliminación de radicales DPPH. La actividad antidiabética *in vitro* de los extractos se realizó con α -glucosidasa pancreática y α -amilasa intestinal, y se comparó con la acarbosa. Ambos extractos mostraron una reducción de la actividad enzimática del 57 al 74%. Además, las pruebas *in vivo* en modelos murinos normoglucémicos mostraron una mejor homeostasis de la glucosa después de la carga de sacarosa, que fue significativamente diferente del control. La actividad antihipertensiva *in vitro* de los extractos se realizó con la enzima convertidora de angiotensina y se contrastó con captopril; ambos extractos mostraron una reducción de la actividad enzimática del 53 al 58%. El extracto de hoja indujo una relajación del 45% en un modelo *ex vivo* de aorta. En el análisis de acoplamiento molecular, la isoamarantina y la isogomphrenina-I mostraron afinidad predictiva de unión para las α -glucosidasas (maltasa-glucoamilasa humana y sacarasa-isomaltasa humana), mientras que la catequina mostró afinidad de unión por la enzima convertidora de angiotensina humana. Los datos de este estudio resaltan el potencial de *A. cruentus* como alimento funcional.

4.2. Introducción

En la última década, el amaranto se ha convertido en un importante tema de investigación debido a su alto valor nutricional y su potencial como pseudocereal (Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012). *Amaranthus cruentus* L., también conocido como amaranto rojo, es una de las muchas especies que ha recibido atención por su excepcional perfil nutricional, que incluye ser libre de gluten, bajo en calorías y grasa por porción, con proteínas de alta calidad y polifenoles, y por las comidas basadas en amaranto que incorporan las hojas en la dieta de medicina tradicional (Gresta *et al.*, 2020; Araujo-León *et al.*, 2023a).

El alto contenido de lisina en el grano de amaranto lo distingue de fuentes de alimentos convencionales, como la soja, el trigo y el arroz, proporcionando aminoácidos esenciales, proteínas de alta calidad y contenido mineral que desempeñan un papel crucial en la nutrición global (Písaříková *et al.*, 2005; Mlakar *et al.*, 2009; Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012; Sunil *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2018). Además de su bien equilibrado perfil de aminoácidos y contenido mineral (Juan *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2018), el amaranto tiene un metabolismo fotosintético C4 distintivo que ofrece ventajas en el rendimiento de la materia seca y la adaptación al estrés ambiental (Sunil *et al.*, 2014; Gresta *et al.*, 2020).

Otra característica distintiva del amaranto son los compuestos naturales acumulados, como las betalaínas, que dan color a las inflorescencias, hojas y tallos de la planta. Las principales betalaínas en amaranto son la amarantina y su epímero isoamarantina (Tekieli *et al.*, 2023). Sin embargo, hasta hace muy poco, se ha evidenciado la diversidad de betalaínas (Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021). Compuestos bioactivos como polifenoles, ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos, flavonoides, taninos y ligninas también se han reportado en el amaranto. Estos compuestos han sido identificados como la causa de las potenciales propiedades antioxidantes y diversas actividades farmacológicas, incluyendo antidiabéticas, antibacterianas o antihelmínticas, asociadas al amaranto que involucran la reducción del estrés oxidativo (Saker y Oba, 2019; Saker *et al.*, 2020). La mayoría de los estudios sobre polifenoles y su impacto en la actividad antioxidante se han centrado en otras especies de *Amaranthus*, diferentes de *A. cruentus* (Bang *et al.*, 2021). Se ha informado la relación entre las betalaínas y actividades farmacológicas como antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria en especies de la familia Amaranthaceae como *Chenopodium formosanum* y *Gomphrena globosa* (Xie y Chen, 2021; Silva *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022).

El amaranto ha sido utilizado durante más de 6,000 años desde la civilización Azteca, que le atribuía propiedades medicinales y mágicas (Sauer, 1967). En México, las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* todavía se utilizan para hacer tamales y una confitura de semillas infladas con miel llamada “alegrías” (Espitia, 1992). En la medicina Ayurveda y Unani, la planta de amaranto tiene múltiples usos. Las semillas son espermogénicas y tónicas. La decocción de la planta se utiliza para reducir la intensidad del sangrado menstrual, y las flores se consideran remedios para la diarrea, la disentería y la tos (Kumar y Goel, 1998; Michael, 2002; Gupta *et al.*, 2004; Khare, 2004; Bi Fong *et al.*, 2005; Rastogi y Shukla, 2013). En Pakistán, las hojas cocidas de *A. cruentus* se utilizan como laxante (Wali y Bussmann, 2019). A pesar de su significado tradicional, aún son escasos los estudios detallados que revelen sus propiedades farmacológicas específicas y perfil fitoquímico, particularmente para enfermedades metabólicas como la diabetes y la hipertensión (Tang y Tsao, 2017). Gran parte de la información sobre las propiedades farmacológicas del amaranto se basa en el análisis de hidrolizados proteicos, que ha revelado péptidos bioactivos que actúan como antidiabéticos, antihipertensivos y antihipercolesterolémicos (Soares *et al.*, 2015; Fisayo *et al.*, 2021; Kamal *et al.*, 2021; Zhu, 2023).

Abordando esta brecha, nuestro estudio examinó el extracto metanólico acuoso de *A. cruentus* para determinar su influencia en enzimas críticas relacionadas con la diabetes y la hipertensión, así como su capacidad antioxidante. Se utilizaron HPLC-UV-DAD y acoplamiento molecular para identificar los compuestos predominantes y dilucidar sus interacciones con las enzimas objetivo.

4.3. Metodología

4.3.1. Material vegetal

Las semillas de amaranto rojo (*A. cruentus*) fueron recolectadas en Valladolid, Yucatán, México. Los materiales recolectados fueron identificados por la Dra. Ivonne Sánchez del Pino. Las plantas de *Amaranthus cruentus* se cultivaron en los jardines al aire libre y en los invernaderos experimentales del CICY. Las hojas e inflorescencias se cosecharon de las plantas después de 60 días de cultivo. Una vez recolectados en el campo, los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y liofilizados a -51 °C durante 72 hs. Una vez secos, los tejidos se molieron utilizando un molino de cuchillas y se almacenaron en la oscuridad a -20 °C hasta su análisis.

4.3.2. Reactivos químicos

Se utilizaron metanol (MeOH) y agua (H₂O) de grado HPLC (Tedia, Fairfield, CT, EE. UU.) como disolventes de extracción. Para el análisis con HPLC-UV-DAD, se emplearon MeOH, acetonitrilo (ACN) y H₂O de grado HPLC (Tedia, Fairfield, CT, EE. UU.), con la fase móvil acidificada usando ácido acético de grado HPLC (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó un extracto de remolacha (Sigma-Aldrich, Cat. # 901266, St. Louis, MO, EE. UU.) como material de referencia. Para la extracción mediante dispersión de fase sólida en matriz (MSPD), se utilizó BondElut-C18 como fase estacionaria, adquirida de Agilent Technologies con un tamaño de partícula de 40 µm (Santa Clara, CA, EE. UU.).

Para la cuantificación por HPLC-UV-DAD de flavonoides y ácidos orgánicos, se adquirieron los siguientes estándares analíticos de Sigma-Aldrich con una pureza superior al 99%: hesperidina, hesperetina, naringina, naringenina, quercetina, catequina, kaempferol, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico. Para las betalaínas, se utilizó betanina de un extracto de remolacha.

4.3.3. Extracción de los fitoquímicos de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus*

Los fitoquímicos, incluyendo las betalaínas, fueron extraídos mediante el método de dispersión de fase sólida en matriz (MSPD) publicado por Araujo-León *et al.* (2023b). Se obtuvo un polvo uniforme moliendo 100 mg de tejido liofilizado a temperatura ambiente en un mortero con 400 mg de fase estacionaria C18 (BondElut-C18). La mezcla sólida se colocó en cartuchos para la extracción en fase sólida. Con la ayuda de un colector de vacío (Visiprep, SUPELCO, Bellefonte, PA, EE. UU.), se eluyeron 9 mL de agua con ácido acético al 0.1%, seguido por una mezcla de agua con ácido acético al 0.1% y metanol (1:1, v/v) a -15 mmHg. Ambos eluatos se recogieron y se evaporaron hasta sequedad. El extracto resultante se resuspendió en una mezcla de agua con ácido acético al 0.1% y metanol (1:1, v/v) y se transfirió a un vial ámbar para su análisis por HPLC-UV-DAD.

4.3.4. Análisis por HPLC-UV-DAD

El análisis por HPLC-UV-DAD se realizó utilizando un equipo Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado a un detector UV/Vis (Ultimate 3000 UV/VIS detector, Dionex). Se inyectó una alícuota de 20 µL de la muestra, se transfirió a un loop de acero inoxidable y luego a una columna Hypersil GOLD C18 (100 × 2,1 mm, tamaño de partícula de

1,9 μm) a un caudal de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. La muestra se eluyó de la columna a un caudal de 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ utilizando un gradiente con H_2O acidulada con ácido acético al 0.1% (disolvente A), MeOH acidulado con ácido acético al 0.1% (disolvente B) y ACN acidulado con ácido acético al 0.1% (disolvente C). El sistema de elución en la columna inició con 100% disolvente A durante 2 minutos, y posteriormente del minuto 2 al 16 se incrementó la proporción de disolvente orgánica hasta un 80% disolvente B y 20% disolvente C. Finalmente, la columna se purgó durante 8 minutos y se estabilizó a la proporción inicial de la corrida. Los datos de los espectros UV/Vis se colectaron a 230, 280, 360, 480 y 540 nm. Las áreas de cada pico se determinaron con el software Chromeleon 7.1 (Thermo Scientific, USA). Los gráficos se obtuvieron utilizando GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4.3.5. Validación del método de HPLC-UV-DAD

El método fue validado de acuerdo con los criterios establecidos en la guía ICH Q2A evaluando precisión, exactitud, linealidad, rango, y los límites de detección y cuantificación.

Linealidad

La prueba de linealidad fue realizada de manera intradía ($n=3$) e interdía ($n=9$). Se prepararon 5 disoluciones multi componente con todos los estándares analíticos en un intervalo de 0.5-5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fueron analizadas por HPLC-UV-DAD. La ecuación de la recta fue generada mediante el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando en cuenta el área bajo la curva del analito frente a la concentración.

La determinación de la pendiente (b), término independiente (a), coeficiente de correlación (r) y la varianza residual ($S_{y,x}^2$), fue realizada utilizando las siguientes fórmulas (ICH Q2A):

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

$$r = \frac{\sum (x - x_m)(y - y_m)}{\sqrt{\sum (x - x_m)^2 \sum (y - y_m)^2}}$$

$$s_{y,x}^2 = \frac{\sum (y - y_m)^2}{n - 2} (1 - r^2)$$

Donde

x: la variable independiente

x_m : media total de la variable independiente

y: la variable dependiente

y_m : media total de la variable dependiente

n: número total de ensayos realizados

Límite de Detección y Cuantificación

La determinación del límite de detección y el límite de cuantificación fue realizada mediante la prueba de disolución en un intervalo de 80 a 120%. Para esto, se elaboró una curva de calibración con el punto más bajo (0.5 µg/mL) que fue evaluado en la linealidad instrumental.

Para calcular los límites, se utilizó la desviación estándar residual ($S_{y,x}$), estableciéndose la siguiente fórmula (ICH Q2A):

$$LD = \frac{3S_{y,x}}{b}$$

$$LC = \frac{10S_{y,x}}{b}$$

$S_{y/x}$ = Desviación estándar residual o ruido

b = Pendiente

LD = Límite de detección

LC = Límite de cuantificación

Precisión y exactitud

La evaluación de la precisión se llevó a cabo de manera intradía ($n = 3$) e interdía ($n = 9$), en tres puntos de la curva de calibración (0.5, 2.5 y 5.0 µg/mL). Con los datos obtenidos del área bajo la curva (ABC) de cada analito se calculó la Desviación Estándar Relativa (DER), evaluando el porcentaje de desviación con respecto a la media para cada ensayo.

La determinación de la exactitud se llevó a cabo mediante el método de añadido-recuperado (ICH Q2A), evaluando 9 determinaciones a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 y 5.0 µg/mL). Con los datos obtenidos del área bajo la curva se calculó el porcentaje de sesgo (% Bias) intradía e interdía, evaluando el porcentaje de desviación con respecto a la media para cada ensayo.

4.3.6. Cuantificación de betalaínas y betaxantinas por espectrofotometría

El contenido de betalaínas y betaxantinas se determinó mediante el método espectrométrico propuesto por Cai *et al.* (1998). Se tomaron 100 mg de tejido seco (hojas e inflorescencias) y se extrajeron con una mezcla H₂O:MeOH (80:20, v/v) acidulada al 0.1% con ácido acético. El material vegetal se colocó en un tubo de 50 mL para centrifuga y se adicionó 25 mL de la mezcla de extracción, se agitó con ayuda de un vórtex durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm a 20 °C. El sobrenadante se transfirió a viales ámbar para su análisis por espectrofotometría.

La cuantificación de betacianinas y betaxantinas se determinó utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Contenido de Betacianinas } \left(\frac{mg}{g}\right) = (A_{536})(PM)(V)(FD)/\epsilon LW$$

$$\text{Contenido de Betaxantinas } \left(\frac{mg}{g}\right) = (A_{480})(PM)(V)(FD)/\epsilon LW$$

Donde para betalaínas A_{536} es la absorbancia medida a 536 nm para el contenido de betacianinas, PM es el peso molecular de la amarantina (726.6 g/mol), y ϵ es el coeficiente de extinción molar para la amarantina ($5.66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$). Para betaxantinas, A_{480} es la absorbancia medida a 480 nm para el contenido de betaxantinas, PM es el peso molecular de la indicaxanthin (308 g/mol), y ϵ es el coeficiente de extinción molar para la indicaxanthin ($4.81 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$). V es el volumen total del extracto en mL, FD el factor de dilución. y W es el peso seco del tejido vegetal utilizado en g.

4.3.6. Cuantificación de compuestos fenólicos

Se utilizaron los respectivos estándares analíticos para determinar la concentración de ácidos orgánicos (ácido vinílico, ácido 4-hidroxi-benzoico, ácido salicílico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico) y flavonoides (hesperidina, hesperetina, naringina, naringenina, quercetina, catequina y kaempferol). Para ello, se elaboraron curvas de calibración mediante un estándar externo en el intervalo de 0.5 a 5 µg/mL. La determinación se realizó utilizando las características espectrales de UV de cada fitoquímico, tiempos de retención y cromatografía con muestras fortificadas con los estándares disponibles. Finalmente, se reportaron los contenidos totales de ácidos orgánicos y flavonoides, sumando todas las concentraciones individuales de cada compuesto.

4.3.7. Ensayo DPPH *in vitro*

Para evaluar la capacidad de captación de radicales libres de los extractos, se siguió la metodología que estableció Shimada *et al.* (1992), utilizando el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). En primer lugar, se disolvieron los extractos metanólicos acuosos de hojas e inflorescencia del amaranto rojo (*A. cruentus*). Luego, se tomaron alícuotas de 150 μL y se combinaron con 1,350 μL de DPPH (0.1 mM en etanol). Se agitó la mezcla en un vórtex y se permitió una reacción durante 30 min a 25 °C en viales ámbar para protegerla de la luz. Una vez que la reacción finalizó, se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 220 UV-VIS) en una longitud de onda de 517 nm. Como testigo, se empleó ácido ascórbico y se realizaron todas las determinaciones en triplicado. Como testigo positivo de la reacción se utilizó ácido ascórbico (vitamina C), por su alta capacidad antioxidante.

El porcentaje de captación de radicales DPPH se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Captación de radicales} = 100 * \left[\frac{AC - AE}{AC} \right]$$

Donde: AC es la absorbancia del testigo y AE es la absorbancia en presencia del extracto.

4.3.7. Ensayo de inhibición de la actividad de la α -amilasa *in vitro*

Para determinar la actividad de la enzima α -amilasa de los extractos metanol acuosos de hojas e inflorescencias de amaranto rojo, se utilizó la metodología descrita por Tamil *et al.* (2010) con ciertas modificaciones. En tubos de 200 μL , se suspendieron 2 mg de almidón en Tris-HCl 0.5 M (pH 6.9) y CaCl_2 0.01 M. La disolución se hirvió durante 5 min y luego se incubó a 37 °C por 5 min. A continuación, se añadieron 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 50% (v/v), 200 μL de los extractos a una concentración de 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 μL de α -amilasa pancreática porcina (2 U/mL) y 500 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) al 0.1%. Esta mezcla se dejó reaccionar por 10 min a 37 °C, y la reacción se detuvo añadiendo 0.5 mL de ácido acético al 50% a cada tubo. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 4,500 rpm a 4 °C durante 10 min y el sobrenadante se analizó mediante espectrofotometría.

La absorbancia del sobrenadante se determinó a una longitud de onda de 540 nm. Como testigo positivo se utilizó el medicamento acarbose. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

La actividad inhibitoria se calculó empleando la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad inhibitoria} = (\text{Ac}+) - (\text{Ac}-) - (\text{As} - \text{Ab}) / (\text{Ac}+) - (\text{Ac}-) \times 100$$

Ac+, es la absorbancia cuando la enzima actúa sin interferencia (disolvente con enzima). Ac-, es la absorbancia cuando la enzima no actúa (disolvente sin enzima). As es la absorbancia cuando la enzima actúa en presencia de muestra. Ab, es la absorbancia del blanco.

4.3.8. Ensayo de inhibición de la actividad de la α -glucosidasa in vitro

Basándose en la inhibición de la α -amilasa, 2 U/mL de α -glucosidasa se disolvió en buffer fosfato y se incubó durante 5 min a 37 °C. Una vez concluido el tiempo, se añadieron 100 μ L de *p*-nitrofenil-glucopiranosido, previamente disuelto en buffer de fosfatos (50 mM, pH 6.8), para dar inicio a la reacción. La mezcla se dejó reaccionar a 37 °C por 1 h. Posteriormente, para detener la reacción, se agregaron 250 μ L de carbonato de sodio 1.0 M a cada tubo. Después, los tubos se centrifugaron a 4,500 rpm a 4 °C durante 10 min y el sobrenadante se sometió a análisis espectrofotométrico. La absorbancia de la mezcla resultante se determinó a una longitud de onda de 405 nm. Como referencia, se empleó el medicamento acarbosa. Todos los análisis de los extractos metanol acuosos de hojas e inflorescencias de “amaranto rojo” se llevaron a cabo en triplicado, usando una concentración de 1,000 μ g/mL. La actividad inhibitoria se determinó utilizando la ecuación propuesta:

$$\text{Actividad inhibitoria} = (\text{Ac}+) - (\text{Ac}-) - (\text{As} - \text{Ab}) / (\text{Ac}+) - (\text{Ac}-) \times 100$$

Ac+, es la absorbancia cuando la enzima actúa sin interferencia (disolvente con enzima). Ac-, es la absorbancia cuando la enzima no actúa (disolvente sin enzima). As es la absorbancia cuando la enzima actúa en presencia de muestra. Ab, es la absorbancia del blanco.

4.3.8. Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) in vitro

La actividad inhibitoria de la ECA de los extractos acuosos de hojas e inflorescencia de “amaranto rojo” fue determinada a una concentración de 1 mg/mL. El ensayo se realizó siguiendo el método de Hayakari *et al.* (1978), en el que la ECA hidroliza la hippuril-L-histidil-L-Leucina hasta producir ácido hipúrico e His-Leu. Este método se fundamentó en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con TT (2,4,6-tricloro-triacina) (Tehreem *et al.*, 2021). A 20 μ L de disolución de ECA (100 mU/mL) se les adicionaron 40 μ L de muestras a concentraciones de 1 mg/mL y fueron incubados en un baño maría (VWR® Heating circulator modelo 1130-2S) a 37 °C por 5 min. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de HHL (hippuril-L-histidil-L-Leucina) al 0.3% en buffer de

fosfato de potasio 40 μmol y buffer de cloruro de sodio 300 μmol , previamente ajustados a pH 8.3. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 45 min. La reacción fue detenida mediante la adición de 360 μL de disolución TT en dioxano (3%, p/v) y 720 μL de buffer de fosfato 0.2 M (pH 8.3). Después, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min y del sobrenadante se midió la absorbancia a 382 nm mediante espectrofotometría (Thermo Scientific Evolution 220 UV-VIS). Como referencia, se empleó el medicamento captopril a una concentración de 0.05 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron en triplicado.

4.3.9. Ensayo de tolerancia a la sacarosa in vivo

Se obtuvieron ratas Wistar macho de alrededor de 250 g del bioterio de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio con un ciclo de luz y oscuridad de 12 h a 25 °C y humedad alrededor del 65%, con dieta certificada y agua *ad libitum*. Todos los experimentos cumplieron con las normas de la Norma Federal Mexicana para la Experimentación y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de 2010 (No. 85-23, edición revisada). Un comité de ética aprobó este protocolo de experimentación animal en octubre de 2017 con el código de certificación 2017-001.

Para el ensayo de tolerancia a la sacarosa se siguió el método descrito por Araujo-León *et al.* (2023c), utilizando ratas normoglucémicas con un ayuno durante 16 h previos a la experimentación. Los grupos experimentales constaron de cinco animales y todas las administraciones se realizaron vía intragástrica. El primer grupo fue el testigo al cual se le administró únicamente disolución salina de NaCl al 0.9% (p/v), el segundo grupo fue el testigo de acarbosa a una dosis de 5 mg/Kg, el tercer grupo fue el testigo con glibenclamida a una dosis de 10 mg/Kg, el cuarto grupo fue el extracto metanol acuoso de hojas de “amaranto rojo” a una dosis de 200 mg/Kg, y finalmente el quinto grupo fue el extracto metanol acuoso de inflorescencias de “amaranto rojo” a una dosis de 200 mg/Kg. De acuerdo con el protocolo de Ortiz-Andrade *et al.* (2017), la medición de la glucosa comenzó posterior a administrar una disolución de sacarosa (2 g/Kg) a los tiempos 0, 0.5, 1, 2 y 4 h. Para la medición de la glucemia en sangre se utilizó un glucómetro comercial (Accu-Check Active, Roche, Basilea, Suiza), con los datos obtenidos se graficó la variación de glucosa (% VG) para cada grupo, considerando el valor inicial a las 0 h, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%VG = \frac{G_x - G_0}{G_0} * 100$$

Donde G_0 es la glucemia inicial en el tiempo 0 h, y G_x es el valor de la glicemia en los tiempos 0.5, 1, 2 y 4 h, respectivamente.

4.3.10. Estudio de acoplamiento molecular

Preparación de ligandos

Las estructuras de los ligandos, incluyendo amarantina, betanina, catequina, gomphrenina-I, hesperetina, isoamarantina, isobetanina, isogomphrenina-I, kaempferol, naringenina y quercetina, fueron optimizadas utilizando el campo de fuerza MMFF94x, implementado en el software MOE (v2022.02; MOE 2022). Primero, los ligandos fueron protonados y se calcularon sus cargas parciales, empleando el algoritmo de gradiente conjugado, con el gradiente RMS establecido en 0.0001 Kcal/mol/Å².

Preparación del blanco

Las estructuras cristalinas de rayos X del ACE humano (PDB id: 1086, resolución de 2 Å), maltasa-glucoamilasa humana (PDB id: 2QMJ, resolución de 1.9 Å), sucrasa-isomaltasa humana (PDB id: 3LPP, resolución de 2.15 Å) y alfa-amilasa pancreática humana (PDB id: 3BAJ, resolución de 2.1 Å) fueron descargadas de la base de datos RCSB (Berman *et al.*, 2000). Las estructuras proteicas fueron preparadas eliminando moléculas extrañas y agua utilizando el software MOE.

El cribado virtual se realizó utilizando AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010; Eberhardt *et al.*, 2021), se evaluaron once inhibidores potenciales (amarantina, betanina, catequina, gomphrenina-I, hesperetina, isoamarantina, isobetanina, isogomphrenina I, kaempferol, naringenina, quercetina) y las respectivas moléculas co-cristalizadas (lisinopril, acarbosa y kotalanol). Las dimensiones de las cajas de la cuadrícula para el receptor ACE humano fueron 24 × 22 × 22, con centro de cuadrícula x = 40.89, centro y = 32.39 y centro z = 47.28; para el receptor maltasa-glucoamilasa humana, fueron 24 × 22 × 22, con centro x = -21.70, centro y = -6.32, centro z = -5.61; para el receptor sucrasa-isomaltasa humano, fueron 26 × 24 × 24, con centro x = 38.52, centro y = 58.56, centro z = 79.25; para el receptor alfa-amilasa pancreática humana, fueron 40 × 28 × 26, con centro x = 8.44, centro y = 15.66, centro z = 40.31; todos usando un espaciado de cuadrícula predeterminado de 1 Å.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Condiciones analíticas por HPLC-UV-DAD para la cuantificación de polifenoles

Se desarrolló y validó un método HPLC-UV-DAD para la identificación y cuantificación de flavonoides, derivados del ácido cinámico y ácidos orgánicos en *A. cruentus*. Los flavonoides examinados fueron quercetina, kaempferol, catequina, hesperetina, naringenina, hesperidina y naringina. Los ácidos cinámicos analizados incluyeron ácido *p*-cumárico (*p*CA), ácido ferúlico (FA) y ácido cafeico (CA). Los ácidos benzoicos analizados fueron ácidos vanílico (VA) y ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA). Se utilizó un sistema de cromatografía de fase inversa, que consistía en una columna C18; el sistema de elución fue por gradiente, utilizando metanol, acetonitrilo y agua con 0.1% de ácido acético. Los cromatogramas se obtuvieron a 230 nm. Los 12 fitoquímicos evaluados se separaron bien, con una correcta resolución como se muestra en la figura 31. Los ácidos cinámicos y la catequina, un flavonoide polar con múltiples grupos hidroxilo, fueron observados entre los 8 a 12 min. Además, se detectaron flavonoides glucosilados como naringina y hesperidina. Finalmente, entre 14 y 21 min, se eluyeron los flavonoides no glucosilados, como quercetina, naringenina, hesperetina y kaempferol.

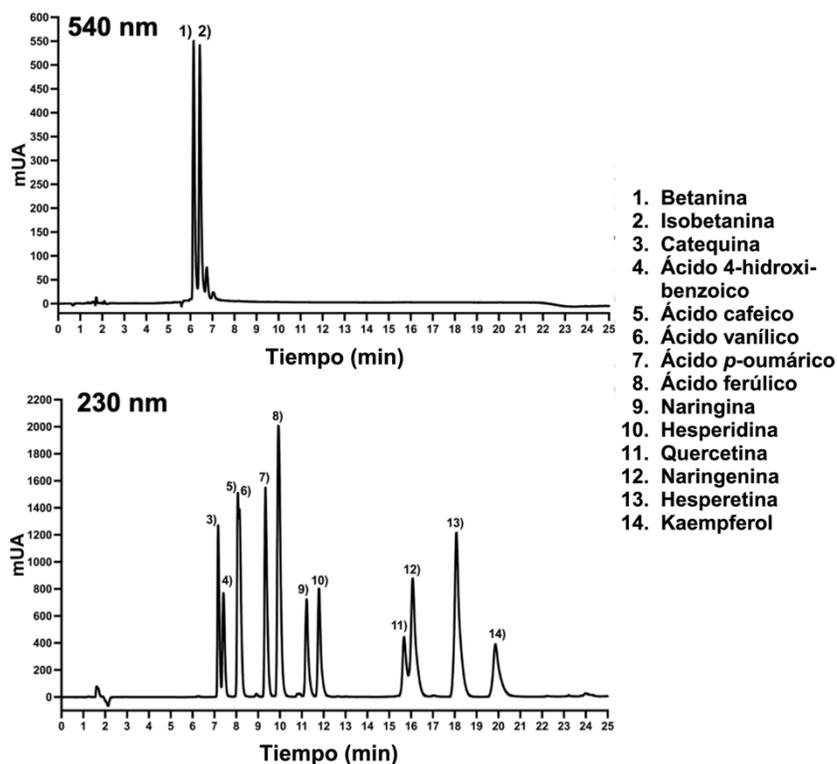


Figura 31. Cromatograma obtenido por HPLC-UV-DAD a 540 nm y 230 nm de los estándares analíticos para la cuantificación de betalainas, flavonoides, ácidos cinámicos y ácidos benzoicos (Araujo-León *et al.*, 2024a).

4.4.2. Validación del método por HPLC-UV-DAD

Para el control de calidad de nuestros resultados, se realizaron curvas de calibración estándar en el intervalo de concentración de 0.5-5.0 µg/mL. Los resultados del análisis de cada fitoquímico (Tabla 4) mostraron que todos los analitos presentaron un coeficiente de correlación superior a 0.991. Utilizando los datos de linealidad, se calculó la desviación estándar tanto de la pendiente (S_b) como del intercepto (S_a), y se establecieron los intervalos de confianza $b \pm t_{(n-2)}S_b$ y $a \pm t_{(n-2)}S_a$. En todos los fitoquímicos analizados, se observó que la pendiente es significativamente diferente de cero y el intercepto sugiere una buena linealidad, pasando por el origen. Los LOD y LOQ se calcularon utilizando la desviación estándar residual ($S_{y/x}$) de la pendiente o ruido, el intervalo en el LOD fue entre 0.01-0.10 µg/mL (ppm), y LOQ fue entre 0.02-0.34 µg/mL. La determinación de la precisión instrumental se obtuvo con las réplicas de la curva de calibración durante el día y en diferentes días, donde se observó que fue menor al 2%. Los resultados obtenidos en el proceso de la calibración cumplen con los parámetros establecidos por la ICH-Q2A en la validación de métodos analíticos.

Tabla 4. Control de calidad para los fitoquímicos evaluados en “amaranto rojo”.

Fitoquímico	Rt	Longitud de onda	Pendiente (b)	Intercepto (a)	r	Ruido ($S_{y/x}$)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Precisión instrumental (0.5 µg/mL)
Catequina	7.15	280	0.45	-0.05	0.9981	0.015	0.10	0.34	0.98%
A4HB	7.41	254	6.41	-0.65	0.9932	0.030	0.01	0.05	1.34%
Acaf	8.11	320	1.29	-0.35	0.9924	0.033	0.08	0.25	1.87%
AV	8.16	254	3.95	-0.49	0.9912	0.034	0.03	0.09	1.29%
ApC	9.35	254	0.83	-0.07	0.9941	0.028	0.10	0.33	1.03%
AF	9.93	254	1.96	-0.02	0.9929	0.030	0.05	0.15	1.56%
Naringina	11.26	280	2.51	-0.26	0.9978	0.016	0.02	0.06	0.36%
Hesperidina	11.83	280	3.22	-0.31	0.9937	0.024	0.02	0.07	1.81%
Quercetina	15.75	360	1.49	-0.99	0.9982	0.018	0.04	0.12	1.27%
Naringenina	16.13	280	5.73	-0.34	0.9975	0.012	0.01	0.02	0.71%
Hesperetina	18.11	280	8.56	-1.14	0.9978	0.014	0.01	0.02	1.64%
Kaemferol	19.96	360	2.52	-1.38	0.9981	0.026	0.03	0.10	1.91%

Para evaluar la precisión y exactitud del método, se realizó un análisis por triplicado de la concentración de 12 fitoquímicos estándar en tres concentraciones distintas (0.5, 2.5 y 5.0 µg/mL). Se determinó tanto la precisión (expresada como porcentaje del Desvío Estándar Relativo, % DSR) como la recuperación para cada fitoquímico en las mediciones durante el día y en diferentes días. Los resultados mostraron una variabilidad en la precisión durante el día entre 1.32 y 4.98% y en la precisión en diferentes días de 1.34 y 4.94%. Asimismo, el porcentaje de recuperación durante el día varió de 83 a 98%, mientras que la variabilidad diferentes días osciló entre 81 y 98% (Tabla 5). Estos valores reflejan las diferencias en precisión y recuperación entre los distintos fitoquímicos y concentraciones analizadas.

Tabla 5. Precisión y recuperación de 12 fitoquímicos en tres concentraciones diferentes.

Fitoquímico	Durante el día $n=3$ (Precisión [% DSR]; Recuperación [%])			En diferentes días $n=9$ (Precisión [% DSR]; Recuperación [%])		
	0.5 $\mu\text{g/mL}$	2.5 $\mu\text{g/mL}$	5.0 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	2.5 $\mu\text{g/mL}$	5.0 $\mu\text{g/mL}$
Catequina	2.77 (88%)	1.95 (91%)	1.84 (98%)	4.65 (84%)	2.68 (88%)	1.67 (94%)
A4HB	3.74 (84%)	1.83 (89%)	1.57 (97%)	3.91 (86%)	2.32 (87%)	1.62 (95%)
Acaf	2.73 (83%)	2.54 (93%)	1.62 (93%)	2.43 (84%)	3.64 (89%)	1.54 (91%)
AV	2.96 (89%)	2.60 (95%)	1.87 (96%)	3.87 (83%)	2.45 (90%)	1.34 (97%)
ApC	4.59 (85%)	2.96 (95%)	1.74 (93%)	2.63 (89%)	3.69 (90%)	1.95 (93%)
AF	3.91 (89%)	1.64 (86%)	1.64 (92%)	2.86 (83%)	3.45 (87%)	1.63 (95%)
Naringina	4.86 (91%)	2.55 (86%)	1.96 (90%)	4.94 (82%)	2.86 (91%)	1.61 (97%)
Hesperidina	3.82 (90%)	1.54 (93%)	1.89 (98%)	3.32 (84%)	3.75 (92%)	1.39 (98%)
Quercetina	4.98 (88%)	1.74 (91%)	1.53 (91%)	3.43 (81%)	3.89 (88%)	1.54 (97%)
Naringenina	3.93 (86%)	1.57 (88%)	1.68 (94%)	3.35 (86%)	2.88 (92%)	1.58 (92%)
Hesperetina	4.77 (83%)	1.79 (92%)	1.55 (96%)	2.87 (89%)	3.80 (87%)	1.98 (95%)
Kaemferol	3.51 (90%)	1.92 (95%)	1.32 (97%)	4.43 (87%)	3.88 (92%)	1.49 (98%)

4.4.3. Cuantificación de polifenoles en *Amaranthus cruentus*

El método analítico desarrollado por HPLC-UV-DAD se utilizó para cuantificar simultáneamente los 12 fitoquímicos, incluyendo flavonoides, ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, en *A. cruentus*. Se registraron y graficaron los espectros UV-Vis de cada fitoquímico a 230 nm. Para confirmar cada señal correspondiente de los fitoquímicos presentes en las muestras liofilizadas de *A. cruentus*, comparamos los espectros UV-Vis y el tiempo de retención con el analito estándar (Figura 32). Los flavonoides más abundantes fueron quercetina, kaempferol, catequina y hesperetina (Figura 33A). La quercetina, un flavonoide que no está glicosilado, se determinó como el más abundante, con una concentración de 1,361 $\mu\text{g/g}$ en hojas y 77.28 $\mu\text{g/g}$ en inflorescencias. El ácido cinámico más abundante fue *p*CA, mientras que VA fue el ácido benzoico con mayor cantidad. Además, cuando los datos de cuantificación obtenidos por HPLC-UV-DAD se calcularon para reflejar el contenido total de flavonoides, ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, encontramos que las hojas de *A. cruentus* producían significativamente más flavonoides ($p < 0.05$) que las inflorescencias, con una relación estimada de 16:1 (Figura 33B). Las hojas tenían una concentración total de flavonoides de $5230 \pm 403 \mu\text{g/g}$ en comparación con las inflorescencias, que mostraron $334 \pm 64 \mu\text{g/g}$. El contenido total de ácidos benzoicos y ácidos cinámicos también fue mayor en las hojas que en las inflorescencias, pero la relación fue menor de 2:1, y sólo las diferencias en ácidos cinámicos fueron significativas. Las hojas y las inflorescencias tenían un total de $317 \pm 12 \mu\text{g/g}$ y $276 \pm 47 \mu\text{g/g}$ de ácidos benzoicos, así como

$643 \pm 15 \mu\text{g/g}$ y $462 \pm 58 \mu\text{g/g}$ de ácidos cinámicos. Las hojas difieren significativamente en su composición química, indicando un perfil de polifenoles más completo, lo que podría tener implicaciones para la investigación farmacológica.

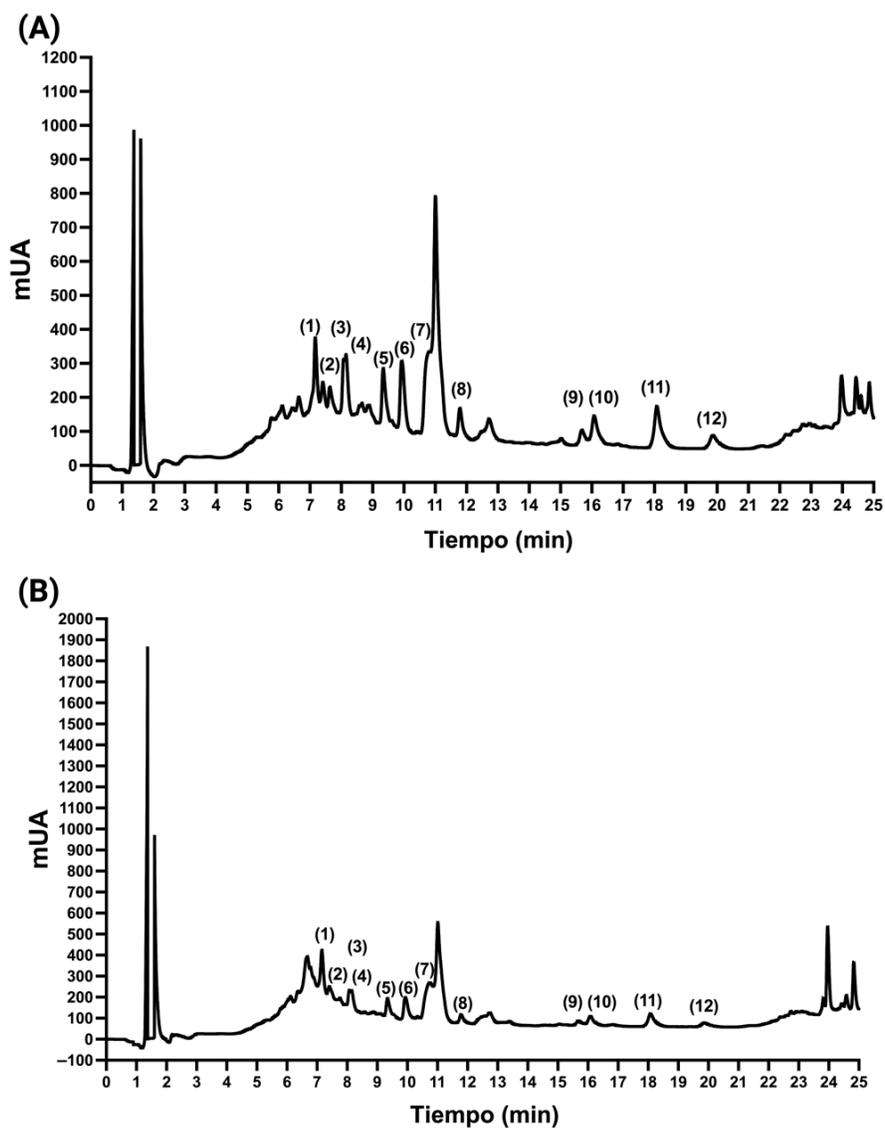


Figura 32. Cromatogramas graficados a 230 nm de las muestras de hojas (A) e inflorescencias (B). Los picos etiquetados del 1 al 12 corresponden a los fitoquímicos con la misma etiqueta en la Figura 31 (Araujo-León *et al.*, 2024a).

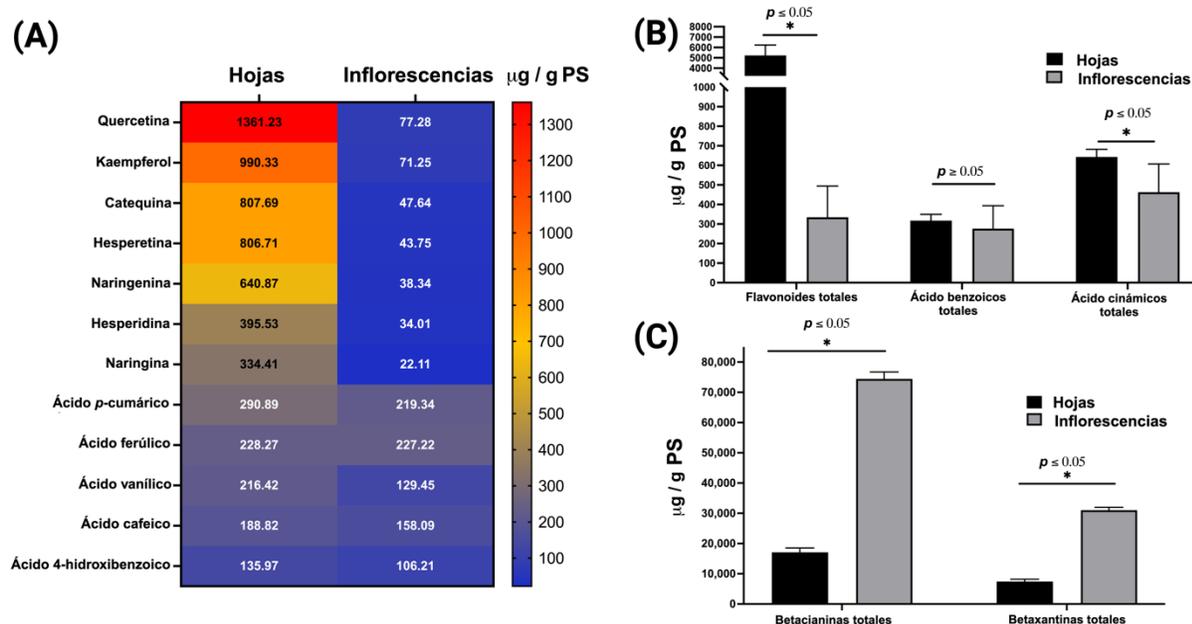


Figura 33. Composición química de polifenoles y betalaínas en hojas e inflorescencias de *A. cruentus*. (A) Mapa de calor de las concentraciones de polifenoles; (B) contenido total de polifenoles incluyendo flavonoides, ácidos benzoicos y ácidos cinámicos; (C) contenido total de betalaínas, que comprende tanto betacianinas como betaxantinas (Araujo-León *et al.*, 2024a).

4.4.4. Cuantificación de betalaínas en *Amaranthus cruentus* L.

El alto contenido de betalaínas en plantas se ha clasificado en dos clases: betacianinas y betaxantinas. En este trabajo, decidimos cuantificar estos pigmentos naturales utilizando el método por espectrofotometría propuesto por Cai *et al.* (1998). El método utiliza el coeficiente de extinción molar de la amarantina ($5.66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) para determinar el contenido de betacianinas y el contenido de betaxantinas con indicaxantina ($4.81 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$). Como se reportó anteriormente, *A. cruentus* produce amarantina e isoamarantina como sus principales betacianinas (Araujo-León *et al.*, 2023b). En las muestras liofilizadas de *A. cruentus* se encontró que la concentración de estos compuestos difiere significativamente ($p < 0.05$) entre las inflorescencias y las hojas. En las inflorescencias se determinó que la concentración de betacianinas fue de $74,425 \pm 934 \mu\text{g/g}$, que fue significativamente mayor que la concentración en las hojas de $17,080 \pm 582 \mu\text{g/g}$, teniendo así cuatro veces más betacianinas (Figura 42C). El contenido de betaxantinas en las inflorescencias fue mayor que el encontrado en las hojas, siendo de $31,010 \pm 389 \mu\text{g/g}$ y $7445 \pm 293 \mu\text{g/g}$, respectivamente. Estos hallazgos destacan una distribución desigual de las betalaínas entre las inflorescencias y las hojas, resaltando la excepcional riqueza de estos pigmentos en las inflorescencias de *A. cruentus*.

El análisis comparativo en 21 genotipos de *Amaranthus* spp. realizado por Cai *et al.* (1998) indicó un rango de concentración de betalaínas de 16 a 47 mg/g en peso seco (PS) en las inflorescencias de *A. cruentus*. Este rango difiere notablemente con la concentración de 74.42 mg/g PS observada en nuestra accesión roja de *A. cruentus*. Esta concentración supera a las encontradas en otras especies de *Amaranthus*, como *A. caudatus* (máximo 28 mg/g), *A. hybridus* (17 mg/g), *A. hypochondriacus* y *A. lividus* (ambos con 19 mg/g), y *A. paniculatus* (30 mg/g). Adicionalmente, en *A. tricolor*, conocido por sus hojas rojas, se reportaron concentraciones entre 24 y 33 mg/g; en nuestro estudio, el contenido fue menor que en *A. tricolor*, con 17.08 mg/g (Cai *et al.*, 1998).

Otro estudio, en 37 especies de 8 géneros dentro de la familia Amaranthaceae, con 26 especies pertenecientes al género *Amaranthus*, reveló concentraciones de betacianinas entre 0.08 y 1.36 mg/g en peso fresco (PF). En este trabajo, *A. cruentus* mostró el contenido más alto de 1.36 mg/g PF, significativamente menor que la concentración de 29.65 mg/g PF observada en nuestra accesión roja de *A. cruentus*, indicando así una concentración mucho mayor en este último con una proporción de 21:1. Esta disparidad llevó a la conclusión de que las especies cultivadas generalmente poseen un contenido más alto de betacianinas en comparación con sus contrapartes silvestres (Cai y Corke, 2001). Además, un estudio que evaluó 48 accesiones de *Amaranthus* en su etapa vegetativa encontró que *A. cruentus*, representado por 28 de estas accesiones, tenía la concentración más alta de betalaínas con 6.55 mg/g PS (Howard *et al.*, 2022).

En un contexto más amplio, investigaciones sobre cultivares rojos de Djulis (*Chenopodium formosanum*) observaron una concentración máxima de betalaínas de 3.4 mg/g PF (Xie y Chen, 2021). En 10 cultivares de nopal (*Opuntia* spp.), los contenidos de betalaínas variaron de 0.05 a 5.29 mg/g PF, con contenido de betaxantinas totales entre 0.12 y 2.86 mg/g (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). La remolacha roja (*Beta vulgaris*) mostró contenidos de betalaínas entre 10.26 y 17.15 mg/g PS (Sawicki y Wiczowski, 2016). Un estudio reciente sobre callos de *Gomphrena globosa* reportó el contenido más alto de betacianinas con 0.37 mg/g PF (Pari *et al.*, 2024). En las cáscaras de frutas de nopal (*Opuntia ficus-indica*), el contenido de betacianinas en peso seco fue de 4.51 mg/g, y las betaxantinas fueron 0.67 mg/g (Karunanithi, 2023). La remolacha en polvo liofilizada mostró una concentración máxima de betacianinas de 4.01 mg/g y de betaxantinas de 3.42 mg/g (Kumar *et al.*, 2023); en la pulpa de pitaya (*Stenocereus thuberi*), el contenido total de betalaínas fue de 2.6 mg/g PS (Rodríguez-Félix *et al.*, 2023). Estas comparaciones nos permiten afirmar que *A. cruentus*, la accesión roja de

Valladolid, Yucatán, México, es excepcionalmente rica en betalainas, convirtiéndola en una fuente natural destacada de estos pigmentos naturales.

Los componentes fenólicos, especialmente los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos y los flavonoides, son compuestos vegetales esenciales y ampliamente estudiados en las especies de *Amaranthus*. Estudios comparativos entre genotipos rojos de *A. tricolor* y genotipos verdes de *A. lividus* revelan una riqueza en ácidos fenólicos y flavonoides en las accesiones rojas. Específicamente, las accesiones rojas mostraron concentraciones fenólicas que oscilan entre 85 y 312 $\mu\text{g/g}$ PS, superiores al rango de las accesiones verdes de 71 a 220 $\mu\text{g/g}$ PS. Estas concentraciones consistieron predominantemente en ácido gálico, ácido vanílico, ácido salicílico, protocatequina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácidos trans-cinámicos. Además, los flavonoides como rutina, quercetina, miricetina y kaempferol fueron abundantes en las accesiones rojas (Khanam y Oba, 2013; Sarker y Oba, 2019). Este perfil concuerda con hallazgos de otros estudios sobre *Amaranthus* spp., destacando la prevalencia de flavonoides como quercetina, rutina, catequina, miricetina, kaempferol y naringenina (Li *et al.*, 2015; Sarker *et al.*, 2020).

En *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus*, los flavonoides que se han identificado son principalmente como 3-rutinósidos de quercetina y kaempferol, con presencia mínima de quercetina no glicosilada. La comparación con otras investigaciones de otros vegetales de hoja, incluyendo espinaca, lechuga y *A. tricolor* tanto accesiones verdes como rojas, revelaron que *A. cruentus* exhibe un perfil polifenólico superior, con concentraciones de 162 $\mu\text{g/g}$ PS para compuestos fenólicos y 125 $\mu\text{g/g}$ para flavonoides, ricos en ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, isoquercetina, rutina, quercetina y kaempferol (Khanam *et al.*, 2012).

El contenido polifenólico en las semillas de *A. cruentus* ha sido documentado, revelando una concentración total de fenoles de 1,214 mg/kg. Kaempferol, que forma el 86% de este contenido, fue el flavonoide predominante, junto con ácidos orgánicos como ácido vanílico, ácido cafeico y ácido *p*-cumárico (Procopet y Oroian, 2022). En las harinas de semillas de *A. hypochondriacus*, la rutina se observó como el flavonoide mayoritario, con concentraciones entre 4 y 10 $\mu\text{g/g}$ y un perfil polifenólico que incluía ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido vanílico, isoquercitrina y nicotiflorina (Barba de la Rosa *et al.*, 2009). Karamac *et al.* (2019) reportaron en *A. caudatus* que en las etapas vegetativas tempranas poseen un contenido fenólico más alto (33 mg/g) comparado con las etapas posteriores (27 mg/g). Este contenido aumentó a través de las etapas de desarrollo, alcanzando un pico de 27 mg/g durante la floración. Las hojas

mostraron concentraciones de polifenoles ligeramente más altas, con un perfil metabólico de 17 compuestos. La rutina fue predominante, variando de 418 a 1,169 µg/g, representando el 95% de los flavonoles. Nuestros resultados corroboran los hallazgos de Kalinova y Dadakova (2009), quienes observaron que la rutina y la quercetina eran más abundantes en las hojas en comparación con las inflorescencias, mientras que las semillas tenían el contenido más alto de metabolitos. La cantidad de quercetina en las hojas de amaranto es influenciada por factores abióticos como la radiación UV-B y UV-C (Mahdavian *et al.*, 2008).

En resumen, nuestro estudio revela que la accesión roja de *A. cruentus* tiene concentraciones significativamente más altas de ácidos orgánicos y flavonoides que otras especies y accesiones, resaltando una contribución significativa para entender la distribución de compuestos fenólicos en *Amaranthus*. Este es el primer estudio que informa el perfil polifenólico en las inflorescencias de esta especie.

4.4.5. Cribado farmacológico *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico* de *A. cruentus*

El cribado farmacológico de los extractos metanólicos acuosos de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus* se realizó para determinar la capacidad antioxidante en la captación y neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), y para determinar la capacidad inhibitoria de las enzimas responsables de la hidrólisis de carbohidratos complejos en humanos y la regulación de la presión arterial. Esta serie de pruebas *in vitro* incluyó testigos positivos como el ácido ascórbico debido a su alta capacidad antioxidante; acarbosa, que inhibe tanto la α -amilasa pancreática como la α -glucosidasa intestinal; y captopril, que inhibe la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La inhibición de la α -amilasa pancreática y la α -glucosidasa intestinal es una estrategia efectiva para la atención de la diabetes, ya que ayuda a reducir y estabilizar la homeostasis de la glucosa (Kajaria *et al.*, 2013; Alqahtani *et al.*, 2020). Inhibir la ECA es una estrategia efectiva para combatir la hipertensión, ya que auxilia en la reducción de la presión arterial alta al relajar las venas y arterias (Wong *et al.*, 2004). Para incentivar la creación de alimentos funcionales basados en amaranto, el propósito de seleccionar estas enzimas fue investigar su inhibición por los extractos metanólicos acuosos y comparar la inhibición de esas enzimas frente a acarbosa y captopril, dos fármacos utilizados actualmente en la medicina.

Ensayo antioxidante con DPPH

El ensayo DPPH reveló que los extractos de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus* neutralizan el radical DPPH en un 52% y 46%, respectivamente, sin diferencias significativas en

la eficacia antioxidante ($p > 0.05$) (Figura 34). Actualmente, la búsqueda de alimentos ricos en antioxidantes es innegable, dado su papel crucial en amenorar el daño oxidativo, lo cual, está vinculado a la patogénesis de numerosas enfermedades. El aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) es generalmente responsable del daño celular, que está asociado con una gama de enfermedades crónicas y degenerativas, incluyendo diabetes, hipertensión, inflamación celular, enfermedad de Parkinson, VIH/SIDA y varios tipos de cáncer (Liu *et al.*, 2023).

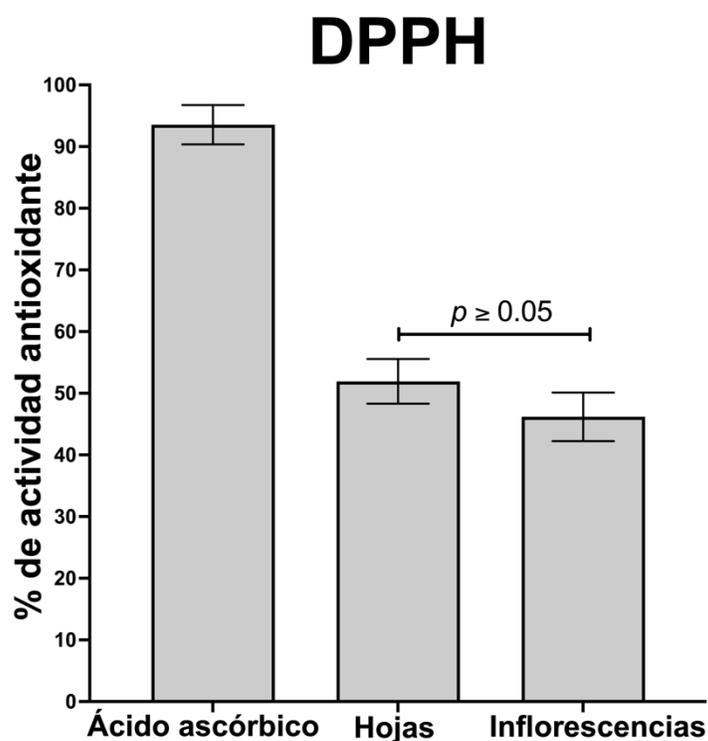


Figura 34. Resultados de la prueba de captación de radicales DPPH de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2024a).

El amaranto (*Amaranthus*) ha sido reconocido como una fuente importante de antioxidantes. Los granos de amaranto contienen moléculas antioxidantes características, incluyendo escualeno, vitamina E, β -caroteno y ácido linoleico. *Amaranthus cruentus* se distingue por su alta concentración de compuestos fenólicos y flavonoides. Además, sus hojas e inflorescencias son ricas en betalainas, como la amarantina y su epímero isoamarantina, que son las más abundantes (Araujo-León *et al.*, 2023b). Estos hallazgos subrayan que el amaranto es una fuente prometedora para terapias antioxidantes naturales.

Las especies pertenecientes al género *Amaranthus* son conocidas por poseer fitoquímicos con actividad antioxidante, lo que contribuye principalmente a sus propiedades medicinales (Adegbola *et al.*, 2020). Estudios en *A. spinosus*, *A. viridis*, *A. graecizans* y *A. hybridus* mostraron excelente actividad en estabilizar el radical DPPH utilizando extractos metanólicos acuosos de hojas. Específicamente, las accesiones rojas de *A. gangeticus* que contienen altas cantidades de betalaínas han sido reportadas que desempeñan un papel crucial en los efectos antioxidantes (Sarker y Oba, 2021), y esto también ha sido reportado en *A. lividus* y *A. hypochondriacus* (Li *et al.*, 2015).

Un grupo clave de metabolitos que contribuye a los efectos antioxidantes en *A. cruentus* es por su rica composición en betalaínas. En nuestro estudio anterior sobre esta accesión roja de *A. cruentus*, reportamos 43 betalaínas, siendo las más abundantes la amarantina, isoamarantina, gomphrenina-I y betanina (Araujo-León *et al.*, 2023b). Las betalaínas, que son derivados de aminoácidos del ácido betalámico, poseen una estructura química aromática amino capaz de estabilizar radicales libres, como el radical DPPH, a través de la donación de electrones (Belhadj Slimen *et al.*, 2017). La amarantina y la isoamarantina extraídas de *A. tricolor* se reportaron valores de inhibición del radical DPPH del 31.1%, mientras que la gomphrenina-I de *Gomphrena globosa* inhibió el 74.5%, y la betanina de *Beta vulgaris* mostró una tasa de inhibición del 50.8% (Cai *et al.*, 2003 y 2005).

Por otra parte, el efecto antioxidante del género *Amaranthus* también es contribuido significativamente por su perfil de polifenoles. La estructura de los polifenoles, como los flavonoides con intermediarios semiquinona, puede estabilizar radicales libres mediante la conjugación de anillos aromáticos y grupos -OH. Quercetina, su glicósido rutina, y las flavanonas naringenina y naringina han demostrado tener un potente poder antioxidante a través de estas vías (Baranowska *et al.*, 2021). Se ha demostrado que kaempferol neutraliza las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de carcinoma hepatocelular (Sharma *et al.*, 2021), sugiriendo sus efectos beneficiosos en ensayos antitumorales y antiinflamatorios (Wang *et al.*, 2018). Con propiedades antioxidantes potentes, las catequinas son moduladas a través de mecanismos directos, como la captación de ROS por quelación de iones metálicos, o mecanismos indirectos que estimulan la activación de enzimas antioxidantes, inhiben enzimas prooxidantes y producen enzimas de desintoxicación de fase II (Bernatoniene y Kopustinskiene, 2018). Naringenina y hesperidina, junto con sus agliconas (naringina y hesperetina), están clasificadas como alternativas prometedoras para la prevención del cáncer y la terapia adyuvante debido a sus potentes efectos antioxidantes, neutralizando ROS y ayudando en la modulación

de la epigenética, señalización de estrógenos, apoptosis e inhibición de la invasión metastásica del tumor (Basso Scandolara *et al.*, 2023).

La riqueza metabólica de *A. cruentus* en betalaínas, flavonoides y ácidos orgánicos permite atribuir a estos metabolitos el poder antioxidante, posicionándolo como un alimento que puede prevenir la oxidación en el consumo crónico y las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Inhibición In Vitro e In Silico de α -Amilasa, α -Glucosidasa y Prueba In vivo de Tolerancia Oral a la Sacarosa

En cuanto a la inhibición de la enzima α -amilasa, los extractos metanólicos acuosos de inflorescencias y hojas no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, el extracto de hoja demostró una mayor eficacia (69%) en la inhibición de esta enzima, superando al extracto de inflorescencia por un 17% (52%). Se observó un patrón similar en la inhibición de la enzima α -glucosidasa, donde el extracto de inflorescencia (54%) superó al extracto de hoja por un 8% (46%, Figura 35).

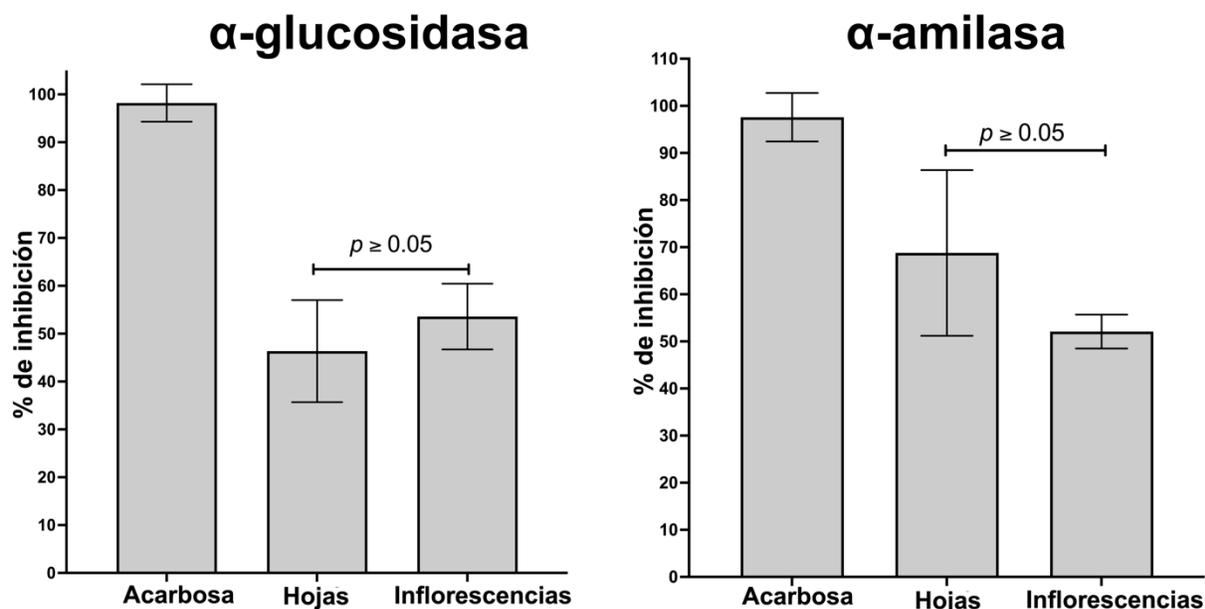


Figura 35. Comparación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa y α -amilasa en extractos de hoja e inflorescencia de *A. cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2024a).

En el estudio realizado *in silico* con la enzima maltasa-glucoamilasa (α -glucosidasa), cuatro compuestos: betanina, isobetanina, catequina e isoamarantina, demostraron una notable

afinidad al sitio de acción, que oscila entre -8.1 y -9.1 kcal/mol. Estos valores superan la afinidad del ligando cocrystalizado acarbosa (testigo / fármaco), que es de -7.9 kcal/mol (Tabla 6). La isoamarantina, con una afinidad de -9.1 kcal/mol, se destacó por bloquear la cavidad del sitio catalítico de la α -amilasa, generando interacciones únicas con Arg202, Thr205, Arg334 y Phe450, mientras mantiene interacción con Tyr299 (Figura 36A).

Tabla 6. Resultados de ΔG (kcal/mol) *in silico* del cribado enzimático.

Ligando	Enzima Convertidora de Angiotensina Humana	Enzima Maltasa-Glucoamidasas Humana	Enzima Sucrosa-Isomaltasa Humana	Enzima Alpha-Amylase Pancreatica Humana
	ΔG (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)
Lisinopril	-7.6	-	-	-
Acarbosa	-	-7.9	-	-9.1
Kotalanol	-	-	-5.9	-
Amarantina	-9.6	-7.1	-6.8	-8.9
Betanina	-9.5	-8.1	-8.6	-9.5
Catequina	-9.9	-8.6	-7.6	-9.5
Gomphrenina-I	-9.4	-7.8	-8.8	-8.6
Hesperetina	-8.1	-7.0	-6.5	-7.7
Isoamarantina	-6.8	-9.1	-8.2	-11.9
Isobetanina	-9.7	-8.3	-8.0	-9.1
Isogomphrenina-I	-9.50	-7.4	-9.0	-8.4
Kaempferol	-8.0	-7.4	-7.7	-9.0
Naringenina	-8.1	-6.9	-6.3	-7.7
Quercetina	-8.3	-7.4	-7.8	-9.1

En cuanto a la sucrasa-isomaltasa, otra α -glucosidasa, todos los compuestos evaluados mostraron afinidades entre -6.3 y -9.0 Kcal/mol, superando la afinidad de -5.9 Kcal/mol del ligando cocrystalizado kotalanol (Tabla 8). Isogomphrenina I fue destacada, con una afinidad de -9.0 Kcal/mol, internalizándose en el sitio catalítico y manteniendo interacciones con Asp355, Trp435 y Asp571, al igual que kotalanol, además de formar nuevas interacciones con Leu233, Asp472, Ser631, Asp632 y Tyr634 (Figura 36B).

Finalmente, en el caso de la α -amilasa pancreática, seis compuestos exhibieron afinidades comparables o superiores a acarbosa, que varían de -9.0 a -11.9 Kcal/mol, con acarbosa teniendo una afinidad de -9.1 Kcal/mol (Tabla 8). Una vez más, isoamarantina se destacó con -11.9 Kcal/mol, ocupando el sitio catalítico de manera similar a acarbosa y conservando interacciones con Trp59, Gln63, Asp195 y Lys200, además de una nueva interacción con Gly306 (Figura 36C).

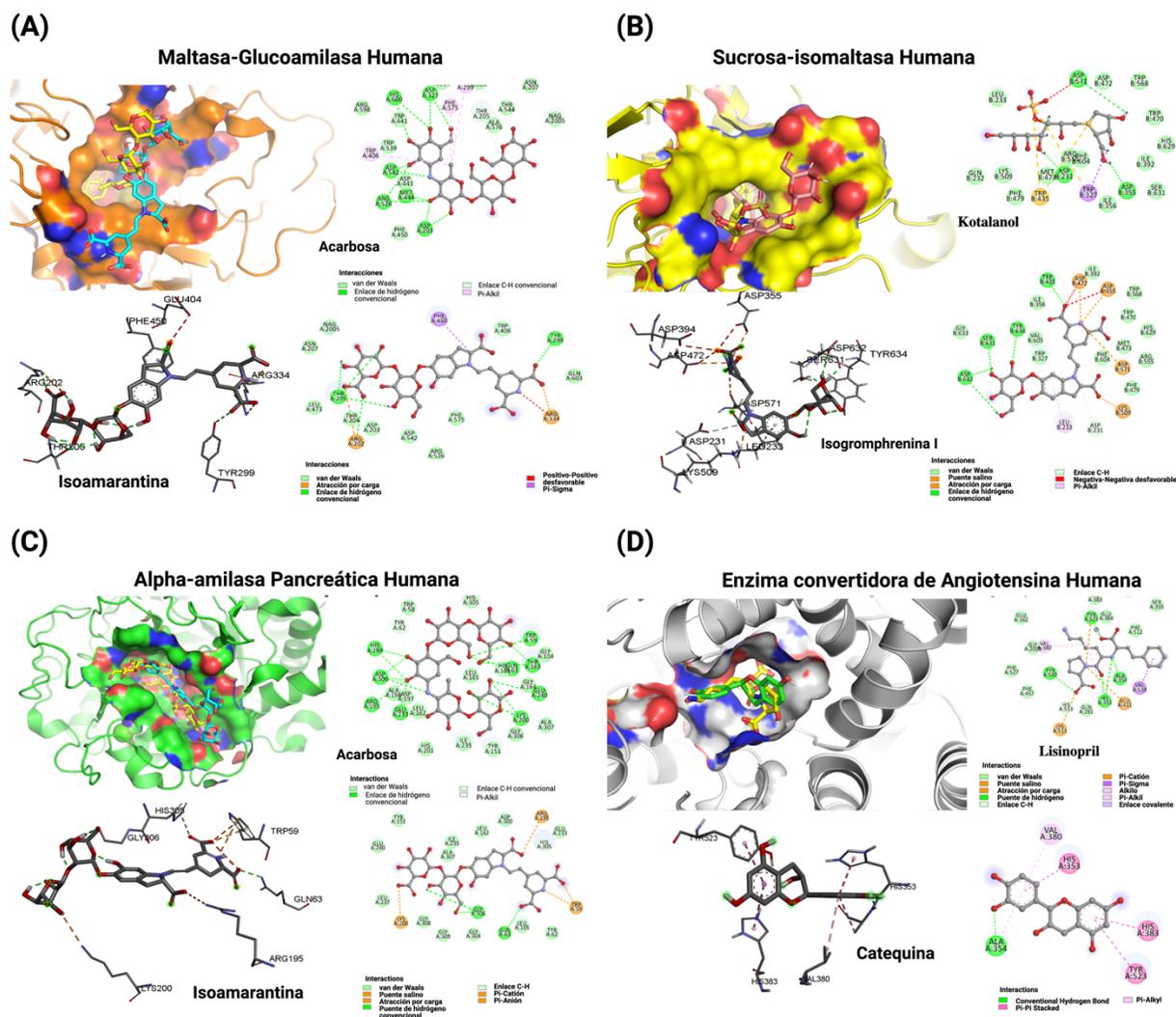


Figura 36. Análisis estructural e interacción de enzimas humanas clave con inhibidores, acompañado de diagramas de interacción 2D. (A) Maltasa-glucoamilasa unida con acarbosa (amarillo) e isoamarantina (-9.1 Kcal/mol, cian). (B) Interacción de sucrasa-isomaltasa con kotalanol (amarillo) e isogomphrenin-I (-9.0 Kcal/mol, salmón). (C) Alpha Amilasa pancreática conjugada con acarbosa (amarillo) e isoamarantina (-11.9 Kcal/mol, cian). (D) Enzima convertidora de angiotensina conjugada con lisinopril (amarillo) y catequina (-9.9 Kcal/mol, verde) (Araujo-León *et al.*, 2024a).

Los resultados del análisis *in vitro* de los extractos de ambos tejidos vegetales nos alentaron para su evaluación en un modelo murino *in vivo*. Dada la capacidad de los extractos para inhibir enzimas clave en la hidrólisis de carbohidratos complejos y su notable potencial antioxidante, se eligió un modelo de prueba de tolerancia a la sacarosa. La sacarosa, un disacárido compuesto de glucosa y fructosa unidas por un enlace glucosídico, puede ser hidrolizada por las enzimas mencionadas anteriormente. El experimento implicó administrar una carga de glucosa (2 g/Kg) a los animales y observar su respuesta al extracto. La hipótesis era que si los extractos inhibían la α -amilasa y la α -glucosidasa en un modelo *in vivo*, la variación del nivel de glucosa en sangre debería ser menor que un testigo negativo (disolución salina). Para alcanzar la variación en los niveles de glucosa en sangre post-administración después de la carga de sacarosa y los extractos, se utilizaron dos medicamentos como testigos positivos: glibenclamida (10 mg/Kg) y acarbosa (5 mg/Kg), conocidos por su capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre.

Usando los extractos metanólicos acuosos de las hojas e inflorescencias de *A. cruentus*, la prueba de tolerancia oral a la sacarosa mostró una disminución en la variación de la glucosa en sangre en comparación con el testigo negativo (disolución salina), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 37). Estos resultados indican que los extractos contribuyen a una mejor recuperación de la homeostasis en los niveles basales de glucosa. Estos hallazgos confirman la existencia de un mecanismo bioquímico y farmacológico en los extractos que modula y mejora la recuperación de la homeostasis glucémica.

Ensayo de Tolerancia a la Sacarosa por vía Oral

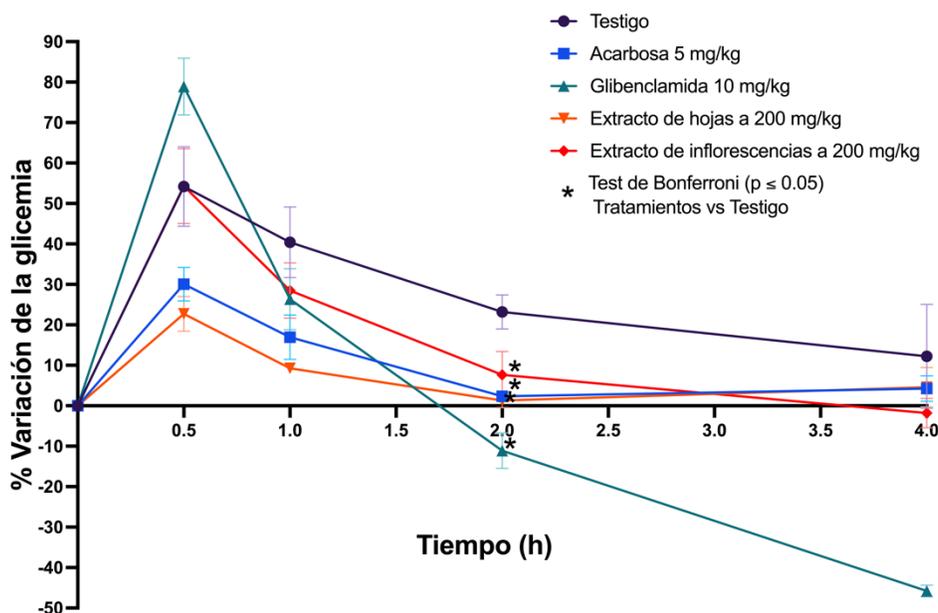


Figura 37. Prueba de tolerancia a la sacarosa por vía oral en un modelo murino normoglucémico utilizando extractos de hojas e inflorescencias de *Amaranthus cruentus* (Araujo-León *et al.*, 2024a).

Al observar el comportamiento de los medicamentos testigos, se notó que la glibenclamida, que actúa sobre la célula beta pancreática modulando la secreción de insulina, causó una disminución pronunciada en los niveles de glucosa. Específicamente, a las 2 h post-administración, se registró una variación de la glucemia del -12% ; a las 4 h, fue del -46% . Por otro lado, la acarbosa, un fármaco que inhibe las enzimas responsables de la hidrólisis de carbohidratos complejos mostró una variación de glucosa en sangre de aproximadamente el 2% después de 2 h post-administración. En comparación, los extractos de hoja mostraron una variación de alrededor del 5% , los extractos de inflorescencia alrededor del 11% y la disolución salina de control mostró una variación del 22% .

Las evaluaciones de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa, así como la prueba de tolerancia oral a la sacarosa, se realizaron para demostrar que los extractos de *A. cruentus* podrían ayudar en la prevención de la diabetes. Los inhibidores de la α -glucosidasa intestinal ralentizan la tasa de absorción de carbohidratos complejos, reduciendo la hiperglucemia postprandial. Los inhibidores comerciales (incluyendo acarbosa, miglitol y voglibosa) actúan mediante la inhibición competitiva en el borde de las células enterocíticas del revestimiento del lumen intestinal, previniendo la absorción de disacáridos como la sacarosa y oligosacáridos, pero

sin afectar a los monosacáridos como la glucosa (Krentz y Bailey, 2005). También se ha observado que estos inhibidores alteran la liberación de hormonas intestinales dependientes de la glucosa, aumentando la secreción de glucagón y disminuyendo las concentraciones de insulina postprandiales (Lebovitz, 1998).

La suplementación con harina de amaranto (*A. hypochondriacus*) al 30% en tortillas de maíz azul ha demostrado inhibir las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (Gámez-Valdez *et al.*, 2021). Además, los extractos metanólicos acuosos de granos de amaranto (*A. cruentus*) y hojas (*A. hybridus*) consumidos en Kenia inhibieron con éxito la α -amilasa y la α -glucosidasa. Los extractos de granos presentaron una inhibición del 35 y 40% para α -amilasa y α -glucosidasa, respectivamente, mientras que los extractos de hojas mostraron una inhibición del 27 y 28%, respectivamente. El estudio concluyó que este efecto inhibitorio se debía a metabolitos fenólicos con capacidad antioxidante, como flavonoides y ácidos orgánicos (Kunyanga *et al.*, 2012). Esta inhibición enzimática también se observó en extractos acuosos de tallos de *Amaranthus* sp., donde se identificaron flavonoides como los principales compuestos fenólicos responsables (Sultana *et al.*, 2020). Las hojas comestibles de *A. inamoenus* y *A. gangeticus* de Taiwán mostraron este potencial antidiabético al inhibir las enzimas mencionadas relacionadas con compuestos polifenólicos (Yang *et al.*, 2020). Un estudio reciente mostró que el chalote (*Allium cepa* L.) enriquecido con amaranto redujo los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas inducidas por estreptomina y tratadas con dosis crónicas durante 14 días. La modulación de este efecto se vinculó a las enzimas intestinales α -glucosidasa y el potencial de los compuestos fenólicos (Omoba *et al.*, 2022).

La actividad inhibitoria de los polifenoles (ácidos orgánicos, flavonoides y catequinas) está bien documentada, con estudios que investigan cómo las posiciones de los hidroxilos afectan las relaciones estructura-actividad (Şöhretoğlu *et al.*, 2023). Nuestros estudios *in silico* encontraron que isoamarantina e isogomphrenina-I exhibieron el ΔG más bajo en su interacción molecular con las enzimas glucosidasa y amilasa. Si bien será necesaria más investigación experimental para estudiar las interacciones de isoamarantina con la enzima de manera más precisa, uno de los desafíos inmediatos podría ser la aislación de isoamarantina de alta pureza. Está establecido que el extracto de remolacha roja, conocido por su alto contenido de betanina, puede inhibir ambas enzimas en el lumen intestinal, lo que lleva a una reducción de los niveles de glucosa postprandial (Madadi *et al.*, 2020). Los extractos etanólicos acuosos de las inflorescencias de *Celosia argentea*, con un contenido de betacianina de 14.52 mg/g y abundante amarantina e isoamarantina, han mostrado actividad inhibitoria de enzimas (Thiyajai *et al.*, 2021). Sin embargo,

la literatura sobre la correlación entre las betalaínas y la inhibición enzimática es escasa. Algunos estudios sugieren que las betalaínas y los polifenoles trabajan juntos en ciertas especies de la familia Amaranthaceae para inhibir estas enzimas, sugiriendo un efecto sinérgico que modula la actividad enzimática (Sawicki *et al.*, 2017; Jimenez-Garcia *et al.*, 2022).

Durante el estudio *in vivo*, observamos que ambos extractos de *A. cruentus* a concentraciones de 200 mg/Kg fueron notablemente más efectivos en mejorar la homeostasis de la glucosa que la disolución salina en el grupo de control. Su comportamiento difirió significativamente de la cinética de glibenclamida, un fármaco que estimula la secreción de insulina, lo que indica que los extractos probablemente no poseen actividad secretagoga. Los extractos de amaranto pueden afectar la digestión de carbohidratos, lo que concuerda con la inhibición observada de la α -amilasa pancreática y la α -glucosidasa intestinal, y con el patrón similar del índice glucémico causado por la administración de extractos o acarbosa. Integrandos el perfil metabolómico, la actividad *in vitro* y la dinámica molecular *in silico*, es posible que las betalaínas sean los metabolitos responsables de esta actividad, y que interactúen de manera sinérgica con el grupo presente de polifenoles. La biodisponibilidad oral de las betalaínas de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) ha sido estudiada en modelos murinos (Sawicki *et al.*, 2017), así como las betalaínas del fruto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en modelos de roedores con inflamación aguda (Allegra *et al.*, 2014). Además, se han observado los efectos antidiabéticos de la betanina en ratas inducidas con estreptozotocina, revelando que los efectos de la betanina están mediados a través de la vía de señalización de la proteína quinasa activada por adenosina 5'-monofosfato (AMPK), el regulador silencioso de información 1 (SIRT1) y el factor nuclear kappa de células B activadas (NF- κ B), posicionando a las betalaínas como fitoquímicos efectivos en el tratamiento de trastornos metabólicos como la diabetes (Abedimanesh *et al.*, 2021).

Inhibición In Vitro e In Silico de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) y resultados del experimento ex vivo de vasorrelajación

Por último, ambos extractos mostraron una eficacia comparable en la inhibición de la ACE, con el extracto de hoja inhibiendo en un 58% y el extracto de inflorescencia en un 53%, con sólo una diferencia del 5% (Figura 38A). Dado que los extractos de *A. cruentus* mostraron una actividad significativa (>50%) contra la ACE, exploramos su efecto potencial sobre la vasorrelajación aórtica murina a través de un experimento *ex vivo*. Observamos que el extracto de hoja indujo una vasorrelajación máxima de aproximadamente el 45% en anillos aórticos con endotelio intacto (E+), superando al extracto de inflorescencia, que alcanzó una tasa del 28% en

condiciones similares. Estos efectos fueron específicos del endotelio, ya que los anillos aórticos sin endotelio (E-) no mostraron cambios significativos en la vasorrelajación (Figura 38B).

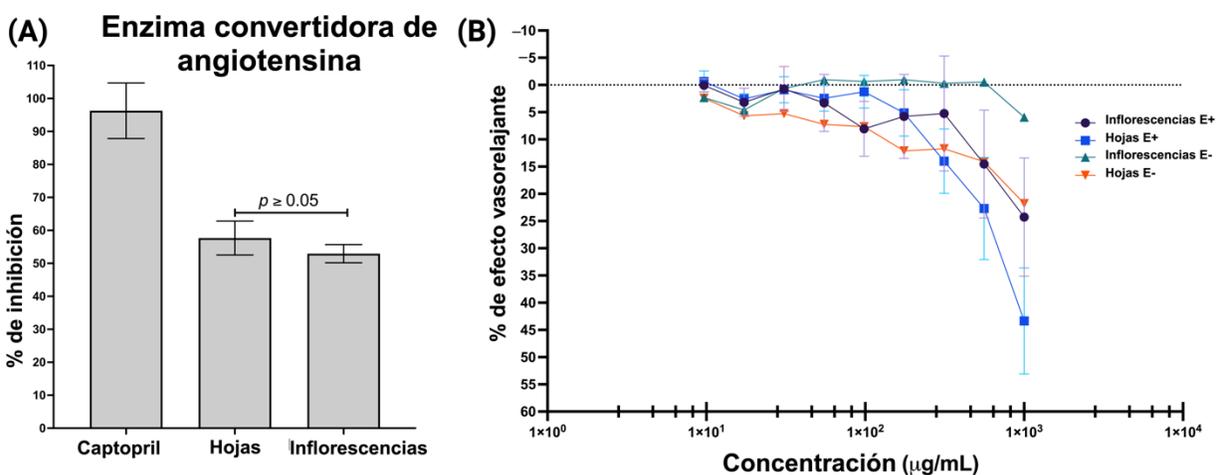


Figura 38. Efecto vasodilatador de los extractos de *A. cruentus* de hojas e inflorescencias. A) Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina y B) Curvas de respuesta de concentración del efecto vasorrelajante: E+: con endotelio y E-: sin endotelio (Araujo-León *et al.*, 2024a).

La investigación sobre los efectos del amaranto en la inhibición de la ACE es escasa. Estudios destacan que los extractos polares de amarantos, específicamente *A. hybridus* y *A. dubius* cultivados en KwaZulu-Natal, Sudáfrica, han mostrado una actividad inhibidora de la ACE prometedora (Ramesar *et al.*, 2008). *Amaranthus hypochondriacus* tiene un componente significativo de semilla, la globulina 11S, conocida por inhibir la ACE, donde se pueden encontrar tetrapéptidos antihipertensivos (Vecchi y Añón, 2009). Investigaciones adicionales en esta especie han llevado al aislamiento de fracciones de péptidos inhibidores de la ACE de la albúmina 1 y la globulina del grano. Notablemente, la albúmina 1 y la globulina mostraron las actividades inhibitorias de la ACE más altas de 40 y 35% después de períodos de hidrólisis de 18 y 15 h, respectivamente (Tovar-Pérez *et al.*, 2009). También se ha confirmado la eficacia de su globulina 7S en la inhibición de la ACE (Quiroga *et al.*, 2012; 2017). Además, los hidrolizados de proteínas de amaranto preparados con cepas de lactobacilos (*L. plantarum* y *L. helveticus*) han demostrado una notable inhibición de la ACE, con una efectividad que alcanza el 45.9% (Sánchez-López *et al.*, 2021).

En el enfoque *in silico* para la ACE, todos los compuestos evaluados, excepto isoamarantina, demostraron afinidad en el rango de -8.0 a -9.9 Kcal/mol, superando la afinidad

del ligando cocrystalizado lisinopril, que tenía una afinidad de -7.6 Kcal/mol (Tabla 6). Notablemente, la catequina, con una afinidad de -9.9 Kcal/mol, mostró la mayor afinidad para esta enzima. La catequina ocupa una parte de la cavidad más expuesta y retiene interacciones con los residuos de unión de lisinopril, incluidos His353, Ala354, Val380 y Tyr523 (Figura 36D).

Las betalaínas del jugo fresco de remolacha roja han demostrado actividad inhibitoria contra la ACE, con una inhibición de hasta el 87% (Sawicki *et al.*, 2019). De manera similar, se describe a los compuestos polifenólicos como potentes inhibidores de la ACE debido a su capacidad antioxidante (Paiva *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Hasta la fecha, ningún estudio en la literatura ha descrito el perfil metabólico integral del amaranto, particularmente vinculando la inhibición de la ACE a las betalaínas y catequinas encontradas en las hojas y las inflorescencias de *A. cruentus*. Además, mientras que la vasorrelajación en la aorta murina puede no tener significancia clínica, es notable que el extracto de amaranto contenga metabolitos que inducen una leve vasorrelajación. Este hallazgo abre el camino para estudios de dosis crónicas del extracto de *A. cruentus* para evaluar la reactividad aórtica, ya que la exposición prolongada a este extracto podría activar mecanismos que involucren óxido nítrico endotelial (NO). En el endotelio vascular, la L-arginina es utilizada por la enzima sintasa de NO endotelial (eNOS) para producir NO y promover la formación de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP). Posteriormente, el cGMP conduce a la vasodilatación, un proceso crucial en el mantenimiento de la homeostasis vascular y la regulación del tono vascular (Moncada *et al.*, 1991; Raddino *et al.*, 2007).

4.5. Conclusiones

En este estudio se evaluó los extractos metanólicos acuosos de las hojas e inflorescencias de *Amaranthus cruentus*, una accesión roja de Valladolid, Yucatán, y se observó que poseen un potencial farmacológico interesante como auxiliares en el tratamiento de la diabetes e hipertensión; debido a la capacidad de los extractos de inhibir enzimas claves (α -amilasa y α -glucosidasa) involucradas en la hidrólisis de carbohidratos complejos, su destacada acción antioxidante y la capacidad para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que contribuyen a estos efectos. La combinación de los mecanismos farmacodinámicos de las enzimas, antes mencionadas, son de crucial importancia para la atención del síndrome metabólico, patología de interés mundial.

Los resultados obtenidos mostraron que las inflorescencias de *A. cruentus* poseen una concentración significativamente mayor de betalainas que las hojas, mientras que éstas últimas, por el contrario, poseen una concentración significativamente mayor de flavonoides comparadas con las inflorescencias. Con base en los resultados obtenidos en el modelo de murinos *in vivo*, obtuvimos evidencia para respaldar la hipótesis de que los extractos poseen propiedades bioquímicas y farmacológicas beneficiosas para la homeostasis glucémica. La comparación entre los extractos tanto de hojas e inflorescencias, con fármacos testigos como la glibenclamida y la acarbosa, se observó que dichos extractos poseen una capacidad prometedora en la regulación de la glucosa en sangre.

Con los resultados obtenidos tanto en el perfil fitoquímico como en el cribado farmacológico, presentamos la primera evidencia que respalda a *Amaranthus cruentus* como un alimento funcional. Según la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), un alimento funcional es una fuente de componentes adicionales que mejoran la salud (Temple, 2022). Esta investigación podría mejorar la percepción del amaranto como un recurso rico en fitoquímicos, lo que podría respaldar su validez medicinal y conducir a nuevas aplicaciones terapéuticas.

4.6. Perspectivas

Este estudio sobre el “amaranto rojo” sienta las bases para una exploración más profunda de los mecanismos bioquímicos y farmacológicos implicados en la regulación de la homeostasis glucémica. Es esencial investigar de manera detallada cómo los extractos de esta planta interactúan a nivel molecular con las enzimas fundamentales en el metabolismo de los carbohidratos y en el control de la glucemia. Las investigaciones futuras deberían enfocarse en evaluar la sinergia existente entre los distintos fitoquímicos bioactivos de estos extractos y su potencial como complementos en tratamientos para enfermedades como la diabetes y la hipertensión. Estos estudios podrían incluir la determinación de la eficacia de los extractos en combinación con medicamentos convencionales, con el objetivo de mejorar los resultados terapéuticos y minimizar los efectos secundarios. Además, es crucial demostrar la seguridad y baja toxicidad de los extractos para su integración en evaluaciones clínicas en humanos, lo que permitiría establecer dosis y protocolos terapéuticos específicos. Dichos estudios podrían abrir caminos innovadores en el tratamiento de enfermedades metabólicas crónicas, destacando el valor del amaranto rojo como un recurso natural importante en la medicina moderna.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el metaboloma de las inflorescencias y hojas de *Amaranthus cruentus* (amaranto rojo) y analizar su posible relación con la actividad antidiabética y antihipertensiva. Para ello, se emplearon técnicas cromatográficas y espectrométricas (LC-MS/MS con analizador Orbitrap y HPLC-UV-DAD), estudios farmacológicos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, así como modelado molecular *in silico*. Estas metodologías permitieron abordar cada uno de los objetivos planteados y, en consecuencia, poner a prueba la hipótesis de investigación.

Uno de los principales desafíos fue la falta de estándares analíticos o materiales de referencia para betalaínas. No obstante, se consultaron trabajos previos (Kumorkiewicz-Jamro *et al.*, 2021; Xie & Chen, 2021; Esteves *et al.*, 2022; Araujo-León *et al.*, 2023b) que proporcionan información analítica y espectrométrica sobre estas moléculas. Con base en estos antecedentes, se desarrolló una metodología analítica por LC-MS/MS Orbitrap, complementada con un método novedoso y eficiente de extracción por dispersión en fase sólida (MSPD). Esta metodología fue validada utilizando muestras de betabel rojo (*Beta vulgaris*) y pitaya morada (*Hylocereus costaricensis*), identificándose un total de 86 betalaínas (31 betacianinas, 36 derivados de betacianinas y 19 betaxantinas), superando el número de análisis reportados por Xie & Chen (2021), quienes documentaron experimentalmente (UV-Vis y MS) un total de 68 betalaínas. Finalmente, con base en los estudios previos y los datos generados en este trabajo, se integró una base de datos compuesta por 140 betalaínas (112 betacianinas y 28 betaxantinas; Araujo-León *et al.*, 2024b). En dicha base se incluyen los principales iones y datos espectrométricos, lo cual permitirá extrapolar estos resultados a otras especies del orden Caryophyllales.

El perfil metabolómico de *A. cruentus* se obtuvo satisfactoriamente aplicando la metodología previamente desarrollada (Araujo-León *et al.*, 2024b), identificándose 43 betalaínas (30 betacianinas y 13 betaxantinas) y 12 polifenoles (incluyendo flavonoides, ácidos cinámicos y benzoicos). Asimismo, se evaluó exitosamente la actividad farmacológica de los extractos orgánicos en modelos experimentales de diabetes e hipertensión, mostrando efectos inhibitorios sobre enzimas clave como α -glucosidasa, α -amilasa y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), así como efectos antihiper glucémicos *in vivo* y vasorrelajantes *ex vivo*, permitiendo

establecer una relación directa entre la composición química del amaranto rojo y su bioactividad (Araujo-León *et al.*, 2023b, 2024a).

Nuestros resultados demostraron que la coloración roja de las inflorescencias y hojas de *Amaranthus cruentus* se debe a la presencia de betalaínas, en particular betacianinas como la amarantina, isoamarantina, gomphrenina-I y betanina (Araujo-León *et al.*, 2023b). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Xie & Chen (2021), quienes identificaron betalaínas similares en *Chenopodium formosanum*, una especie perteneciente a la familia Amaranthaceae. Asimismo, los extractos metanólicos acuosos mostraron potencial antidiabético y antihipertensivo, al inhibir enzimas clave del metabolismo de carbohidratos, mejorar la tolerancia a la glucosa en modelos murinos y provocar vasorrelajación en anillos aórticos. La evidencia experimental e *in silico* indica que estos efectos están relacionados con la presencia de fitoquímicos específicos, principalmente betalaínas y polifenoles como la catequina, quercetina y rutina. Estos compuestos mostraron interacciones favorables con dianas terapéuticas como la maltasa-glucoamilasa, sucrasa-isomaltasa, α -amilasa pancreática y la enzima convertidora de angiotensina (ECA; Araujo-León *et al.*, 2024a). La aproximación farmacodinámica sugiere que los extractos actúan modulando rutas metabólicas clave relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la regulación vascular: inhiben de manera competitiva enzimas digestivas, disminuyen la conversión de angiotensina I a II, y posiblemente activan la vía endotelial del óxido nítrico, favoreciendo la vasodilatación (Araujo-León *et al.*, 2024a). Se ha propuesto que las betalaínas y los polifenoles son responsables de las propiedades antioxidantes y diversas actividades farmacológicas, como la antidiabética, antibacteriana y antihelmíntica, al reducir el estrés oxidativo (Sarker & Oba, 2019; Sarker *et al.*, 2020).

Finalmente, la hipótesis planteada en esta tesis, que la coloración roja de *A. cruentus* está relacionada con su contenido de betalaínas, y que la caracterización cualitativa y cuantitativa de su metaboloma permitiría identificar fitoquímicos con estructuras químicas privilegiadas responsables de las actividades antidiabética y antihipertensiva, ha sido satisfactoriamente comprobada, con fundamento en los resultados fitoquímicos, farmacológicos y computacionales obtenidos, los cuales aportan evidencia sólida de la relación estructura-actividad de los compuestos identificados.

5.2. Conclusiones generales

En esta tesis se logró establecer una metodología analítica por MSPD para la extracción de metabolitos polares en hojas e inflorescencias de amaranto, la cual permite eluir fitoquímicos como betalaínas, ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides, permitiendo colectar las fracciones en un vial cromatográfico que puede inyectarse de manera directa a un sistema LC-MS/MS o HPLC-UV-DAD para el análisis de perfiles cromatográficos. Este método analítico sumado al desarrollo de un método espectrométrico en tándem (MS/MS) nos permitió identificar los iones conservados en las betalaínas: ácido betalámico, betacianinas, derivados de betacianinas y betaxantinas. La aplicación simultánea de MSPD y LC-MS/MS nos permitió identificar en betabel y pitaya más de 80 betalaínas y proponer la estructura de una nueva betacianina con su epímero correspondiente. Presentamos el primer estudio que establece una huella cromatográfica con tiempo de retención y tiempo de retención relativo respecto al tiempo de retención de la betanina, que es el único material de referencia en el mercado. La información cromatográfica y HRMS hace posible la comparación como un método ortogonal para comparar con investigaciones posteriores de betalaínas en plantas. Finalmente, logramos mediante análisis *in silico* establecer los patrones de fragmentación de más de 100 betalaínas identificadas en la literatura con el respaldo de 80 betalaínas identificadas experimentalmente en nuestro laboratorio.

Con la metodología de extracción por MSPD y el método LC-MS/MS con analizador de Orbitrap se logró establecer el primer reporte en la literatura del perfil de betalaínas en hojas e inflorescencias de amaranto rojo (*A. cruentus*), identificando seis betacianinas de tipo amarantina, dos betacianinas de tipo gomphrenina, 22 betacianinas de tipo betanina y 13 de betaxantinas, además de los derivados de betacianinas procedentes de reacciones de descarboxilación y oxidación. Conociendo el perfil de betalaínas de nuestra accesión roja, se exploró el contenido de polifenoles (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides) y se demostró que tanto las hojas como las inflorescencias poseen potencial antioxidante, antidiabético y antihipertensivo, además se exploró la interacción farmacodinámica con enzimas claves, y se logró tener evidencia *in vitro*, *in vivo* e *in silico* que la aproximación farmacodinámica está relacionada con la inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos complejos y con la enzima convertidora de angiotensina.

5.3. Perspectivas

Finalmente, las perspectivas que se obtienen de la presente tesis son las siguientes:

1. La metodología analítica por MSPD y su acoplamiento con técnicas de alta resolución como LC-MS/MS abren nuevas posibilidades para futuras investigaciones en el campo de la fitoquímica y la química de productos naturales. Este enfoque no sólo se aplica al género *Amaranthus*, sino también a la familia Amaranthaceae e incluso al orden Caryophyllales, donde las betalainas desempeñan un papel crucial como pigmentos exclusivos de este orden.
2. La estrategia farmacológica y farmacodinámica empleada en el presente estudio permite explorar nuevos extractos del género *Amaranthus* y otros amarantos que presentan inflorescencias y hojas con una amplia gama de coloraciones. Es probable que existan variaciones significativas en la modulación de la actividad antidiabética y antihipertensiva en estos extractos, lo cual abre la puerta a la identificación de nuevos compuestos bioactivos con potenciales aplicaciones terapéuticas.

Estas perspectivas no sólo amplían el conocimiento científico sobre las propiedades bioquímicas del amaranto y otros amarantos, sino que también ofrecen una plataforma para el desarrollo de nuevas aplicaciones en la biotecnología, la medicina y la nutrición. La capacidad de identificar y caracterizar metabolitos polares en diferentes especies de plantas promete avances significativos en la estandarización y autenticación de productos naturales, garantizando su calidad y eficacia en aplicaciones farmacológicas y nutraceuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedimanesh, N., Asghari, S., Mohammadnejad, K., Daneshvar, Z., Rahmani, S., Shokoohi, S., Farzaneh, A. H., Hosseini, S. H., Anarkooli, I. J., Noubarani, M. (2021). The anti-diabetic effects of betanin in streptozotocin-induced diabetic rats through modulating AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway. *Nutrition & Metabolism*, 18(1), 92.
- Achigan-Dako, E. G., Sogbohossou, O.E.D., Maundu, P. (2014). Current knowledge on *Amaranthus* spp.: research avenues for improved nutritional value and yield in leafy amaranths in sub-Saharan Africa. *Euphytica*, 197, 303–317.
- Adegbola, P. I., Adetutu, A., Olaniyi, T. D. (2020). Antioxidant activity of *Amaranthus* species from the Amaranthaceae family—A review. *South African Journal of Botany*, 133, 111–117.
- Allegra, M., Ianaro, A., Tersigni, M., Panza, E., Tesoriere, L., Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy. *Journal of Nutrition*, 144(2), 185–192.
- Alqahtani, A. S., Hidayathulla, S., Rehman, M. T., ElGamal, A. A., Al-Massarani, S., Razmovski-Naumovski, V., Alqahtani, M. S., El Dib, R. A., AlAjmi, M. F. (2020). Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from *Nuxia oppositifolia*. *Biomolecules*, 10(1), 61.
- Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-Del Pino, I., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., Brito-Argáez, L. G. (2022). Más allá de los colores del amaranto. *Desde el Herbario CICY*, 14(1), 117–122.
- Araujo-León, J. A., Sánchez-Del Pino, I., Aguilar-Hernández, V., Peraza-Sánchez, S. R., Ortiz-Andrade, R., Xingú-López, A., Brito-Argáez, L. G., Alcocer Espejel, J. N. (2023a). El amaranto o *huauhtli* sagrado del México prehispánico y alimento de alto valor nutricional del México contemporáneo. *Desde el Herbario CICY*, 15(1), 123–128.
- Araujo-León, J. A., Aguilar-Hernández, V., Sánchez-del Pino, I., Brito-Argáez, L., Peraza-Sánchez, S. R., Xingú-López, A., Ortiz-Andrade, R. (2023b). Analysis of red amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) betalains by LC-MS. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 67(1), 227–239.

- Araujo-León, J. A., Segura-Campos, M. R., Ortiz-Andrade, R., Vazquez-Garcia, P., Carvajal-Sánchez, D., Cabañas-Wuan, Á., González-Sánchez, A. A., Uuh-Narvaez, J., Sánchez-Salgado, J. C., Fuentes-Noriega, I., *et al.* (2023c). Hypoglycemic and antihyperglycemic potential of flavonoid fraction from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck in normoglycemic and diabetic rats. *Scientia Pharmaceutica*, 91(1), 46.
- Araujo-León, J.A., Sánchez-del Pino, I., Ortiz-Andrade, R., Hidalgo-Figueroa, S., Carrera-Lanestosa, A., Brito-Argáez, L.G., González-Sánchez, A., Giacomán-Vallejos, G., Hernández-Abreu, O., Peraza-Sánchez, S.R., *et al.* (2024a). HPLC-Based Metabolomic Analysis and characterization of *Amaranthus cruentus* leaf and inflorescence extracts for their antidiabetic and antihypertensive potential. *Molecules*, 29, 2003.
- Araujo-León, J.A., Sánchez-del Pino, I., Brito-Argáez, L.G., Peraza-Sánchez, S.R., Ortiz-Andrade, R., Aguilar-Hernández, V. (2024b). *In Silico* mass spectrometric fragmentation and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) betalainic fingerprinting: identification of betalains in red pitaya. *Molecules*, 29, 5485.
- Aydoğan C. (2020). Recent advances and applications in LC-HRMS for food and plant natural products: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 9, 1973–1991.
- Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2365–2376.
- Bang, J., Lee, K. J., Jeong, W. T., Han, S., Jo, I., Choi, S. H., Cho, H., Hyun, T. K., Sung, J., Lee, J., *et al.* (2021). Antioxidant activity and phytochemical content of nine *Amaranthus* species. *Agronomy*, 11(5), 1032.
- Baranowska, M., Koziara, Z., Suliborska, K., Chrzanowski, W., Wormstone, M., Namieśnik, J., & Bartoszek, A. (2021). Interactions between polyphenolic antioxidants quercetin and naringenin dictate the distinctive redox-related chemical and biological behavior of their mixtures. *Scientific Reports*, 11(1), 1–18.
- Barba de la Rosa, A., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J., De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable

- food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49(1), 117–121.
- Barkociová, M., Tóth, J., Sutor, K., Drobnicka, N., Wybraniec, S., Dudík, B., Bilková, A., Czige, S. (2021). Betalains in edible fruits of three cactaceae taxa—*Epiphyllum*, *Hylocereus*, and *Opuntia*—their LC-MS/MS and FTIR identification and biological activities evaluation. *Plants*, 10, 2669.
- Basso Scandolara, T., Fontana Mezoni, M., Galvani, M., Rodrigues Ferreira Seiva, F., Panis, C., & Miranda-Sapla, M. M., Pavanelli, W. R. (2023). Naringenin and hesperidin as promising alternatives for prevention and co-adjuvant therapy for breast cancer. *Antioxidants*, 12(3), 586.
- Belhadj Slimen, I., Najar, T., Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 675–689.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.
- Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D. M. (2018). The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules*, 23(4), 965.
- Bi Fong, L., Bor Luen, C., Jin Yuarn, L. (2005). *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of β -lymphocytes *in vitro*. *International Immunopharmacology*, 5(4), 711–722.
- Brenner, D.M., Baltensperger, D.D., Kulakow, P.A., Lehmann, J.W., Myers, R.L., Slabbert, M.M., Sleugh, B.B. (2010). Genetic Resources and Breeding of *Amaranthus*, en: Plant Breeding Reviews, Janick, J. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 227–285.
- Bressani, R., Sánchez-Marroquín, A., Morales, E. (1992). Chemical composition of grain amaranth cultivars and effects of processing on their nutritional quality. *Food Reviews International*, 8(1), 23–49.
- Broda, Johanna y Jorge Félix Béz. (2001). Cosmovisión, ritual e identidad de los pueblos indígenas de México. Fondo de Cultura Económica, Ciudad de México, pp. 47–65.

- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., Pink, D. (2003). The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1(1), 3–22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J. F., Wu, S. H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., Leaver, C. J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 42(4), 567–585.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A.M., Kohen, R., Livrea, M.A. (2002). Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6895–901.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (1998). Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4491–4495.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1971–1978.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 370–376.
- Caselato-Sousa, V. M., Amaya-Farfán, J. (2012). State of knowledge on amaranth grain: A comprehensive review. *Journal of Food Science*, 77(3), R93–R104.
- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758–5764.

- Choo, W.S., Yong, W.K., Gengatharan, A. (2014). Stability of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) betalains in an encapsulated system under various storage conditions. *Food Chemistry*, 157, 234–240.
- Coelho, L. M., Faria, C., Madalena, D., Genisheva, Z., Martins, J. T., Vicente, A. A., Pinheiro, A. C. (2022). Valorization of amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain extracts for the development of alginate-based active films. *Molecules*, 27(18), 5798.
- Contreras-Llano, L.E., Guerrero-Rubio, M.A., Lozada-Ramírez, J.D., García.Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2019). First betalain-producing bacteria break the exclusive presence of the pigments in the plant kingdom. *mBio*, 10(2), e00345–19.
- Costea, M., Sanders, A., Waines G. (2001). Structure of the pericarp in some *Amaranthus* L. (Amaranthaceae) species and its taxonomic significance. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 20(2), 51–60.
- Costea, M., Weaver, S. E., Tardif, F. J. (2004). The biology of Canadian weeds. 130. *Amaranthus retroflexus* L., *A. powellii* S. Watson and *A. hybridus* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(2), 631–668.
- Cruz, S., Checa, N., Tovar, H., Cejudo-Bastante, M.J., Heredia, F.J., Hurtado, N. (2024). Semisynthesis of betaxanthins from purified betacyanin of *Opuntia dillenii* sp.: Color stability and antiradical capacity. *Molecules*, 29, 2116.
- Cunha, L.C., Monteiro, M.L.G., Costa-Lima, B.R., Guedes-Oliveira, J.M., Alves, V.H., Almeida, A.L., Tonon, R.V., Rosenthal, A., Conte-Junior, C.A. (2018). Effect of microencapsulated extract of pitaya (*Hylocereus costaricensis*) peel on color, texture and oxidative stability of refrigerated ground pork patties submitted to high pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 49, 136–145.
- Das, S. (2016). *Amaranthus: A Promising Crop of Future*. Springer Singapore, pp. 1–172.
- Ding, L., Wang, K.J., Jiang, G.M., Liu, M.Z., Gao, L.M. (2007). Photosynthetic rate and yield formation in different maize hybrids. *Biologia Plantarum*, 51(1), 165–168.
- Durán, Fray Diego de. (1984). *Historia de las Indias de Nueva España e islas de la tierra firme*. Editorial Porrúa, tomo I, Ciudad de México, pp. 45-70.

- Dziki, D., Rozyło, R., Gawlik-Dziki, U., Swieca, M. (2014). Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 40(1), 48–61.
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898.
- Ee, S.C., Jamilah, B., Muhammad, K., Hashim, D.M., Adzahan, N. (2014). Physico-chemical properties of spray-dried red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel powder during storage. *International Food Research Journal*, 21, 155–160.
- Escribano, J., Pedreno, M.A., Garcia-Carmona, F., Munoz, R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9, 124–127.
- Escribano, J., Santos-Buelgas, C., Garcia-Carmona, F. (2017). Development of a protocol for the semisynthesis and purification of betaxanthins. *Phytochemical Analysis*, 17, 262–269.
- Espitia Rangel E., Mapes Sánchez C., Escobedo López D., De la O Olán M., Rivas Valencia P., Martínez Trejo G., Cortés Espinoza L., Hernández Casillas J. M. (2010). Conservación y uso de los recursos genéticos de Amaranto en México. INIFAP, Centro de Investigación Regional Centro, Celaya, Guanajuato, México, pp. 200-220.
- Espitia, E. (1992). Amaranth germplasm development and agronomic studies in Mexico. *Food Reviews International*, 8(1), 71–86.
- Esquivel, P., Stintzing, F.C., Carle, R. (2007). Pigment pattern and betaxanthin profiles of selected Central American pitaya (*Hylocereus* spp.) genotypes. *European Food Research and Technology*, 224, 697–709.
- Esteves, L.C., Machado, C.O., Gonçalves, L.C.P., Cavalcante, V.F., Obeid, G., Correra, T.C., Bastos, E.L. (2022). Structural effects on the antioxidant properties of amino acid betaxanthins. *Antioxidants*, 11, 2259.
- European Commission, D. E. o. A., Off. J. European Union L221 (2002) 8–36.

- FDA (2025). FDA to Revoke Authorization for the Use of Red No. 3 in Food and Ingested Drugs. <https://www.fda.gov/food/hfp-constituent-updates/fda-revoke-authorization-use-red-no-3-food-and-ingested-drugs> [Acceso 06 de marzo de 2025].
- Fernandez-Lopez, J.A., Angosto, J.M., Gimenez, P.J., Leon, G. (2013). Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 11–17.
- Fisayo Ajayi, F., Mudgil, P., Gan, C. Y., Maqsood, S. (2021). Identification and characterization of cholesterol esterase and lipase inhibitory peptides from amaranth protein hydrolysates. *Food Chemistry: X*, 12, 100165.
- Gámez-Valdez, L. C., Gutiérrez-Dorado, R., Gómez-Aldapa, C. A., Perales-Sánchez, J. X. K., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E. O., Mora-Rochín, S., Reyes-Moreno, C. (2021). Effect of the extruded amaranth flour addition on the nutritional, nutraceutical and sensory quality of tortillas produced from extruded creole blue maize flour. *Biotecnia*, 23(1), 103–112.
- García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y. (2017). Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. pruinosus* and *S. stellatus*). *Food Chemistry*, 234, 111–118.
- García-López, D. M., Kantún-Cahum, M. L., Ibarra-Morales, A., Sánchez-del Pino I. (2021). El amaranto silvestre: de tu acera a tu mesa. *Desde el Herbario CICY*, 13, 7–11.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., Choo, W.S. (2015). Betalains: natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT Food Science and Technology*, 64, 645–649.
- Gonçalves, LCP, Trassi MAD, Lopes NB, Dörr FA, dos Santos MT, Baader WJ, Oliveira VX, Bastos EL. (2012). A comparative study of the purification of betanin. *Food Chemistry*, 131, 231–238.
- Gorinstein, S., Vargas, O.J.M., Jaramillo, N.O. *et al.* (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*, 225, 321–328.

- Gresta, F., Meineri, G., Oteri, M., Santonoceto, C., Lo Presti, V., Costale, A., & Chiofalo, B. (2020). Productive and qualitative traits of *Amaranthus cruentus* L.: An unconventional healthy ingredient in animal feed. *Animals*, 10(8), 1428.
- Guo, S. H., Hu, N., Li, Q. S., Yang, P., Wang, L. L., Xu, Z. M., Chen, H. J., He, B. Y., Zeng, E. Y. (2018). Response of edible amaranth cultivar to salt stress led to Cd mobilization in rhizosphere soil: A metabolomic analysis. *Environmental Pollution*, 241, 422–431.
- Gupta, A. K., Sharma, M., Tandon, N. (2004). Reviews on Indian medicinal plants. Indian Council of Medical Research, pp. 54–60.
- Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 78(2), 361–369.
- Heinrich, M. (2005). ¿Estudios metabolómicos Nuevas oportunidades para la fitoquímica? *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(006), 106.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science*, 69, C491–C498.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose) monitored by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analyses. *European Food Research and Technology*, 219, 377–385.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2005). Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2603–2616.
- Hernández Galicia, G. (2014). Estudio metabolómico por métodos cromatográficos de algunas especies del género *Ferocactus* (Cactaceae). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 18.

- Hernández-Ledesma, P.H, Berendsohn, G., Borsch, T., *et al.* (2015). A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order Caryophyllales. *Willdenowia*, 45(3), 281–383.
- Himelblau, E., and Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1317–1323.
- Howard, J. E., Villamil, M. B., Riggins, C. W. (2022). Amaranth as a natural food colorant source: Survey of germplasm and optimization of extraction methods for betalain pigments. *Frontiers in Plant Science*, 13, 932440.
- Iamónico, D. (2015). Amaranthaceae Juss. En Euro+Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Recuperado el 10 de marzo de 2022, de <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameCache=Amaranthus&PTRefFk=7300000>.
- Jain, G., Gould, K.S. (2015). Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants? *Environmental and Experimental Botany*, 119, 48–53.
- Jang, C., Chen, L., Rabinowitz, J. D. (2018). Metabolomics and isotope tracing. *Cell*, 173(4), 822–837.
- Jerz, G., Skotzki, T., Fiege, K., Winterhalter, P., Wybraniec, S. (2008). Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1190, 63–73.
- Jimenez-Garcia, S. N., Garcia-Mier, L., Ramirez-Gomez, X. S., Aguirre-Becerra, H., Escobar-Ortiz, A., Contreras-Medina, L. M., Garcia-Trejo, J. F., Feregrino-Perez, A. A. (2022). Pitahaya peel: A by-product with great phytochemical potential, biological activity, and functional application. *Molecules*, 27(17), 5339.
- Jin, G., Liu, Y., Xue, S., Meng, Y., Yan, J., Yang, F., Guo, Z., Zhu, J., Liang, X. (2019). Determination of three carotenoids in microalgae by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 82, 1593–1601.

- Joshi, D. C., Sood, S., Hosahatti, R., Kant, L., Pattanayak, A., Kumar, A., Yadav, D., Stetter, M. G. (2018). From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(9), 1807–1823.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2007). Electrophoretic characterization of *Amaranthus* L. seed protein and its systematic implication. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155(1), 57–63.
- Kajaria, D., Tiwari, S., Tripathi, J., Tripathi, Y., Ranjana. (2013). *In-vitro* α -amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug-Shirishadi. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 206–209.
- Kalinova, J., & Dadakova, E. (2009). Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(1), 68–74.
- Kamal, H., Mudgil, P., Bhaskar, B., Fisayo, A. F., Gan, C.-Y., Maqsood, S. (2021). Amaranth proteins as potential source of bioactive peptides with enhanced inhibition of enzymatic markers linked with hypertension and diabetes. *Journal of Cereal Science*, 101, 103308.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. (2001). Betalains-a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178–5185.
- Karamać, M., Gai, F., Longato, E., Meineri, G., Janiak, M. A., Amarowicz, R., Peiretti, P. G. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition of amaranth (*Amaranthus caudatus*) during plant growth. *Antioxidants*, 8(6), 173.
- Karunanithi, A. (2023). Influence of extraction techniques on betalain yield and bioactive phytochemical analysis of nopal fruit peels. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 57(2), 1078–1086.
- Khan, M.I. (2016). Stabilization of betalains: a review. *Food Chemistry*, 197 Pt B, 1280–1285.
- Khan, M.I., Giridhar, P. (2015). Plant betalains: chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267–295.

- Khanam, U. K. S., Oba, S. (2013). Bioactive substances in leaves of two amaranth species, *Amaranthus tricolor* and *A. hypochondriacus*. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(1), 47–58.
- Khanam, U. K. S., Oba, S., Yanase, E., Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 979–987.
- Khare, C. P. (2004). Indian herbal remedies: Rational Western therapy, Ayurvedic and other traditional usage, botany. Springer, pp. 50.
- Kind, T., Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, 2, 23–60.
- Krentz, A. J., Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65(3), 385–411.
- Kugler, F., Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* Alef. Cv. Bright Lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2975–2981
- Kumar, K., Goel, A. K. (1998). Little known ethno-medicinal plants of Santhal and Paharia tribals in Santhal Paragana, Bihar, India. *Ethnobotany*, 10(1), 66–69.
- Kumar, R., Methven, L., Oruna-Concha, M. J. (2023). A comparative study of ethanol and citric acid solutions for extracting betalains and total phenolic content from freeze-dried beetroot powder. *Molecules*, 28(17), 6405.
- Kumorkiewicz A, Wybraniec S. (2017). Thermal degradation of major gomphrenin pigments in the fruit juice of *Basella alba* L. (Malabar Spinach). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7500–7508.
- Kumorkiewicz-Jamro, A., Świergosz, T., Sutor, K., Spórna-Kucab, A., Wybraniec, S. (2021). Multi-colored shades of betalains: recent advances in betacyanin chemistry. *Natural Product Reports*, 38(12), 2315–2346.

- Kumorkiewicz, A., Szmyr, N., Popena, Ł., Pietrkowski, Z., Wybraniec, S. (2019). Alternative mechanisms of betacyanin oxidation by complexation and radical generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 7455–7465.
- Kunyanga, C. N., Imungi, J. K., Okoth, M. W., Biesalski, H. K., Vadivel, V. (2012). Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 269–276.
- Kusznierewicz, B., Mróz, M., Koss-Mikołajczyk, I., Namieśnik, J. (2021). Comparative evaluation of different methods for determining phytochemicals and antioxidant activity in products containing betalains — verification of beetroot samples. *Food Chemistry*, 362, 130132.
- Law, S. R., Chrobok, D., Juvany, M., Delhomme, N., Lindén, P., Brouwer, B., Ahad, A., Moritz, T., Jansson, S., Gardeström, P., Keech, O. (2018). Darkened leaves use different metabolic strategies for senescence and survival. *Plant Physiology*, 177(1), 132–150.
- Le Bellec, F., Vaillant, F., Imbert, E. (2006). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*, 61, 237–250.
- Lebovitz, H. E. (1998). Postprandial hyperglycaemic state: importance and consequences. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 40, S27–S28.
- Li, H., Deng, Z., Liu, R., Zhu, H., Draves, J., Marcone, M., Sun, Y., Tsao, R. (2015). Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 75–81.
- Lim, C.M., Lal, S.K., Isa, N.M., Omar, A.R., Choo, W.S. (2024). Betacyanins from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) exhibit antiviral response against influenza A virus. *Heliyon*, 10, e33049.
- Liu, J., Han, X., Zhang, T., Tian, K., Li, Z., Luo, F. (2023). Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 16(1), 116.

- Mabry, T.J. (2001) Selected topics from forty years of natural products research: Betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids. *Journal of Natural Products*, 64: 1596–1604.
- Madadi, E., Mazloum-Ravasan, S., Yu, J. S., Ha, J. W., Hamishehkar, H., Kim, K. H. (2020). Therapeutic application of betalains: A review. *Plants*, 9(9), 1219.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantari, K. M. (2008). The effects of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annuum* L. *Turkish Journal of Botany*, 32(1), 25–33.
- Maillard, A., Diquélou, S., Billard, V., Laîné, P., Garnica, M., Prudent, M., Garcia-Mina, J. M., Yvin, J. C., Ourry, A. (2015). Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science*, 6, 317.
- Manyelo, T.G., Sebola, N.A., Hassan, Z.M., Ng'ambi, J.W., Weeks, W.J., Mabelebele, M. (2022). Chemical composition and metabolomic analysis of *Amaranthus cruentus* Grains harvested at different stages. *Molecules*, 19, 623.
- Matos, Moctezuma Eduardo. (2010). Pirámides como centro del universo. *Arqueología mexicana*, Vol. XVII, No.101. Raíces, Ciudad de México, pp. 30–39.
- McClung de Tapia, Emily, Diana Martínez Yrizar, Emilio Ibarra Morales y Carmen Cristina Adriano Morán. (2014). Los orígenes prehispánicos de una tradición alimentaria en la Cuenca de México. *Anales de Antropología* 48 (I). UNAM, Ciudad de México, pp. 97–121.
- McClung de Tapia, Emily. (2016). Amaranto desde el punto de vista arqueológico. *Arqueología mexicana*, Vol. XXIII, No.138. Raíces, Ciudad de México, pp. 2–25.
- Michael, H. (2002). South American medicinal plants: Botany, remedial properties and general use. In I. Roth & H. Lindorf (Eds.), Springer.
- Miguel, M.G. (2018). Betalains in some species of the Amaranthaceae family: a review. *Antioxidants*, 7(53), 1-18.

- Mihai Costea. (2012). *Amaranthus hypochondriacus*, in Jepson Flora Project (eds.). Jepson eFlora, https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=12928, accessed on May 29, 2022.
- Minh Thu, T.T., Jerz, G., Winterhalter, P. (2019). The application of ion-pair high-performance countercurrent chromatography monitored by off-line LC-ESI-MS/MS injections to study betalain metabolite from Vietnamese red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Vietnam Journal of Chemistry*, 57, 531–537.
- Mlakar, S. G., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M., Bavec, F. (2009). Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura*, 6(1), 43–53.
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109–140.
- Morante, López Rubén B. (2001). El Pico de Orizaba en la cosmovisión del México prehispánico. La Montaña en el paisaje ritual. Johanna Broda, Stanislaw Iwaniszewski y Arturo Montero (Eds), Conaculta- INAH, Ciudad de México, pp. 49–63,
- Mosshammer, M.R., Rohe, M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2007). Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill. cv. 'Gialla') betalains as affected by the juice matrix and selected food additives. *European Food Research and Technology*, 225, 21–32.
- Nana, F. W., Hilou, A., Millogo, J. F., Nacoulma, O. G. (2012). Phytochemical composition, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus hybridus* L. extracts. *Pharmaceuticals*, 5(6), 613–628.
- Niveyro, S.L., Mortensen, A.G., Fomsgaard, I.S. *et al.* (2013). Differences among five amaranth varieties (*Amaranthus* spp.) regarding secondary metabolites and foliar herbivory by chewing insects in the field. *Arthropod-Plant Interactions*, 7, 235–245.
- Nkobole, N., Prinsloo, G. (2021). ¹H-NMR and LC-MS based metabolomics analysis of wild and cultivated *Amaranthus* spp. *Molecules*, 26(4), 795.
- Noratto, G., Carrion-Rabanal, R., Medina, G., Mencia, A., Mohanty, I., Gonzalez, D. and Murphy, K. (2015). Quinoa protective effects against obesity-induced intestinal inflammation. *The FASEB Journal*, 29, 602.9.

- Nurmahani, M.M., Osman, A., Abdul Hamid, A., Mohamad Ghazali, F., Pak Dek, M.S. (2012). Antibacterial property of *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus* peel extracts. *International Food Research Journal*, 19, 77–84.
- Ogwu, M. (2020). Value of *Amaranthus* [L.] Species in Nigeria, en: Nutritional Value of Amaranth. Viduranga Waisundarav (Ed.). IntechOpen, London, pp. 928.
- Omoba, O. S., Olagunju, A. I., Akinrinlola, F. O., Oluwajuyitan, T. D. (2022). Shallot-enriched amaranth-based extruded snack influences blood glucose levels, hematological parameters, and carbohydrate degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 46(7), e14098.
- Ortiz-Hernández, Y.D., Carrillo-Salazar, J.A. (2012). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a short review. *Comunicación Científica*, 3, 220–237.
- Paiva, L., Lima, E., Marcone, M., Baptista, J. (2023). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition and biological activities of green and black tea samples from Azorean *Camellia sinensis*. *Journal of Functional Foods*, 107, 105701.
- Palmeros-Suárez, P.A., Massange-Sánchez, J.A., Martínez-Gallardo, N.A., Montero-Vargas, J.M., Gómez-Leyva, J.F., Délano-Frier, J.P. (2015). The overexpression of an *Amaranthus hypochondriacus* NF-YC gene modifies growth and confers water deficit stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 240, 25–40.
- Pari, M., Lee, W. Q., Wong, C. K. F., Teh, C. Y. (2024). Induction of callus culture through plant growth regulators supplementation and the effect of elicitors on enhancement of betalain synthesis using *Gomphrena globosa*. *Plant Cell - Tissue and Organ Culture*, 156(1), 19.
- Pasko, P., Bartónn, H., Zagrodzki, P., Chłopiczka, J. Izewska, A., Gawlik, M., Gawlik, M., Gorinstein, S. (2011). Effect of amaranth seeds in diet on oxidative status in plasma and selected tissues of high fructose-fed rats. *Food Chemistry*. 126, 85–90.
- Paško, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fołta, M., Zachwieja, Z. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115(3), 994–998.

- Patel, S., Rauf, A. Edible Plant Pigments. (2020). Betalains as functional food components and natural colorants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 2402–2415
- Piattelli, M., Minale, L., Prota, G. (1965). Pigments of Centrospermae—III: betaxanthins from *Beta vulgaris* L. *Phytochemistry*, 4, 121–125.
- Písaříková, B., Zralý, Z., Kračmar, S., Trčková, M., Herzig, I. (2005). Nutritional value of amaranth (genus *Amaranthus* L.) grain in diets for broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*, 50(12), 568–573.
- Polturak, G., Aharoni, A. (2018). "La vie en rose": biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments. *Molecular Plant*, 11(1), 7–22.
- Procopet, O., Oroian, M. (2022). Amaranth seed polyphenol, fatty acid and amino acid profile. *Applied Sciences*, 12(4), 2181.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Nardo, A. E., Añón, M. C. (2017). *In vitro* modulation of renin-angiotensin system enzymes by amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides: Alternative mechanisms different from ACE inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415–7423.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Ventureira, J. L., Martínez, E. N., Añón, M. C. (2012). Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 397–403.
- Raddino, R., Caretta, G., Teli, M., Bonadei, I., Robba, D., Zanini, G., Madureri, A., Nodari, S., Dei Cas, L. (2007). Nitric oxide and cardiovascular risk factors. *Heart International*, 3(1), 18–26.
- Ramesar, S., Baijnath, H., Govender, T., Mackraj, I. (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of nutritive plants in KwaZulu-Natal. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 331–336.
- Rastogi, A., Shukla, S. (2013). Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), 109–125.

- Rocchetti, G., Tomas, M., Zhang, L., Zengin, G., Lucini, L., Capanoglu, E. (2020). Red beet (*Beta vulgaris*) and amaranth (*Amaranthus* sp.) microgreens: effect of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on the untargeted metabolomic profile. *Food Chemistry*, 332, 127415.
- Rodrigues Vieira, T.R., Lima, A.B., Ribeiro, C.M.C.M., De Medeiros, P.V.Q., Converti, A., Dos Santos Lima, M., Maciel, M.I.S. (2024). Red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) as a source of betalains and phenolic compounds: ultrasound extraction, microencapsulation, and evaluation of stability. *LWT - Food Science and Technology*, 196, 115755.
- Rodríguez-Félix, F., Cárdenas-López, J. L., Montañó-Leyva, B., Del-Toro-Sánchez, C. L., Juárez-Onofre, J. E., Carvajal-Millán, E., Tapia-Hernández, J. A., Castro-Enríquez, D. D. (2023). Optimization of the extraction of betalains from the pulp of pitaya (*Stenocereus thurberi*) and its antioxidant capacity. *Food Analytical Methods*, 16(6), 1252–1260.
- Sadowska-Bartosz, I., Bartosz, G. (2021). Biological properties and applications of betalains. *Molecules*, 26, 2520.
- Saenko II, Deineka VI, Deineka LA. (2015). Specific features of the determination of betacyanins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 70, 892–896.
- Sahagún, Fray Diego de. (2013). *Historia General de las Cosas de la Nueva España*. Editorial Porrúa, Ciudad de México.
- Salazar Zaragoza, R. (1998). Evaluación de las características de las especies *Malva parviflora* y *Amaranthus hybridus* para la recuperación de la cubierta vegetal en el enterramiento controlado Bordo Xochiaca. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 5.
- Sánchez-del Pino, I., Dorantes-Euan, A., Ibarra-Morales, A. (2019). First record of the agricultural and invasive weed *Amaranthus palmeri* (Amaranthaceae) for the flora of the Yucatan Peninsula and update of the diversity of *Amaranthus* in the region. *Botanical Sciences*, 97(3), 433–446.

- Sánchez-del Pino, I., Flores Olvera, H., Valdés, J. (1999). La familia Amaranthaceae en la flora halófila y gipsófila de México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, 70(1), 29–135.
- Sánchez-López, F., Robles-Olvera, V. J., Hidalgo-Morales, M., Tsopmo, A. (2021). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of *Amaranthus hypochondriacus* seed protein hydrolysates produced with lactic bacteria and their peptidomic profiles. *Food Chemistry*, 363, 130320.
- Sandoval-Ortega, M.H., Siqueiros-Delgado, M.E., Sosa-Ramírez, J., Cerros-Tlatilpa, R. (2017). Amaranthaceae (Caryophyllales) richness and distribution in the state of Aguascalientes, Mexico. *Botanical Sciences*, 95(2), 203–220.
- Sarker, U., Oba, S. (2019). Antioxidant constituents of three selected red and green color *Amaranthus* leafy vegetable. *Scientific Reports*, 9(1), 18233.
- Sarker, U., & Oba, S. (2021). Color attributes, betacyanin, and carotenoid profiles, bioactive components, and radical quenching capacity in selected *Amaranthus gangeticus* leafy vegetables. *Scientific Reports*, 11(1), 11559.
- Sarker, U., Hossain, M. M., Oba, S. (2020). Nutritional and antioxidant components and antioxidant capacity in green morph *Amaranthus* leafy vegetable. *Scientific Reports*, 10(1), 1336.
- Sauer, J. D. (1967). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54(2), 103.
- Sawicki, T., Bączek, N., Wiczowski, W. (2016). Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods*, 27, 249–261.
- Sawicki, T., Juśkiewicz, J., Wiczowski, W. (2017). Using the SPE and micro-HPLC-MS/MS method for the analysis of betalains in rat plasma after red beet administration. *Molecules*, 22(12), 2137.

- Sawicki, T., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Wiczowski, W., Peñas, E., Bączek, N., Zieliński, H. (2019). The effect of processing and *in vitro* digestion on the betalain profile and ACE inhibition activity of red beetroot products. *Journal of Functional Foods*, 55, 229–237.
- Schliemann, W., Kobayashi, N., Strack, D. (1999). The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction. *Plant Physiology*, 119(4), 1217–1232.
- Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environmental Science & Technology*, 48(4), 2097–8.
- Sekiguchi, H., Ozeki, Y., Sasaki, N. (2010). *In vitro* synthesis of betaxanthins using recombinant DOPA 4,5-dioxygenase and evaluation of their radical-scavenging activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12504–12509.
- Sharma, N., Biswas, S., Al-Dayyan, N., Alhegaili, A. S., Sarwat, M. (2021). Antioxidant role of kaempferol in prevention of hepatocellular carcinoma. *Antioxidants*, 10(9), 1419.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945–948.
- Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., Pinho, B. R., Andrade, P. B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135(2), 756–763.
- Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., Jakopic, J. (2015). HPLC-MSn identification of betalain profile of different beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) parts and cultivars. *Journal of Food Science*, 80, C1952–C1958.
- Slimen, I.B., Najar, T., Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 675–68.
- Soares, R. A. M., Mendonça, S., De Castro, L. Í. A., Menezes, A. C. C. C. C., Arêas, J. A. G. (2015). Major peptides from amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 4150–4160.

- Şöhretoğlu, D., Renda, G., Arroo, R., Xiao, J., Sari, S. (2023). Advances in the natural α -glucosidase inhibitors. *eFood*, 4(1), e112.
- Spórna-Kucab, A., Wróbel, N., Kumorkiewicz-Jamro, A., Wybraniec, S. (2020). Separation of betacyanins from *Iresine herbstii* Hook. ex Lindl. leaves by high-speed countercurrent chromatography in a polar solvent system. *Journal of Chromatography A*, 1626, 461370.
- Stafford, H.A. (1994). Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sciences*, 101, 91–98.
- Steffensen, S. K., Pedersen, H. A., Labouriau, R., Mortensen, A. G., Laursen, B., de Troiani, R. M., Noellemeyer, E. J., Janovska, D., Stavelikova, H., Taberner, A., Christophersen, C., Fomsgaard, I. S. (2011). Variation of polyphenols and betaines in aerial parts of young, field-grown *Amaranthus* genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12073–12082.
- Stetter, M. G., Vidal-Villarejo, M., Schmid, K. J. (2019). Parallel seed color adaptation during multiple domestication attempts of an ancient new world grain. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 1407–1419.
- Stintzing, F. C., Schieber, A., Carle, R. (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry*, 77, 101–106.
- Stintzing, F., Carle R. (2007). Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 514–525
- Stintzing, F., Schliemann, W. (2007). Pigments of fly agaric (*Amanita muscaria*). *Zeitschrift für Naturforschung. C*, 62, 779–785.
- Stintzing, F.C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U., Carle, R. (2004). Structural Investigations on betacyanin pigments by LC-NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 65, 415–422.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. (2002). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2302–2307.

- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247–269.
- Suh, D. H., Lee, S., Heo, D. Y., Kim, Y. S., Cho, S. K., Lee, S., Lee, C. H. (2014). Metabolite profiling of red and white pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) for comparing betalain biosynthesis and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8764–8771.
- Sultana, R., Alashi, A. M., Islam, K., Saifullah, M., Haque, C. E., Aluko, R. E. (2020). Inhibitory activities of polyphenolic extracts of Bangladeshi vegetables against α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase, renin, and angiotensin-converting enzyme. *Foods*, 9(6), 844.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., *et al.* (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*, 3, 211–221.
- Sunil, M., Hariharan, A. K., Nayak, S., Gupta, S., Nambisan, S. R., Gupta, R. P., Panda, B., Choudhary, B., & Srinivasan, S. (2014). The draft genome and transcriptome of *Amaranthus hypochondriacus*: a C4 dicot producing high-lysine edible pseudo-cereal. *DNA Research*, 21(6), 585–602.
- Tamil, I. G., Dineshkumar, B., Nandhakumar, M., Senthilkumar, M., Mitra, A. (2010). *In vitro* study on α -amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, *Phyllanthus amarus*. *Indian Journal of Pharmacology*, 42(5), 280–282.
- Tang, Y., Tsao, R. (2017). Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(7).
- Tang, Y., Zhang, B., Li, X., Chen, P. X., Zhang, H., Liu, R., Tsao, R. (2016). Bound phenolics of quinoa seeds released by acid, alkaline, and enzymatic treatments and their antioxidant and α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(8), 1712–1719.

- Tehreem, S., Rahman, S., Bhatti, M. S., Uddin, R., Khan, M. N., Tauseef, S., El-Seedi, H. R., Bin Muhsinah, A., Uddin, J., Musharraf, S. G. (2021). A UPLC-DAD-based bio-screening assay for the evaluation of the angiotensin converting enzyme inhibitory potential of plant extracts and compounds: pyroquinazoline alkaloids from *Adhatoda vasica* as a case study. *Molecules*, 26(23), 6971.
- Tekieli, A., Kisiel, A., Grzegorzczak, A., Starzak, K., Wybraniec, S. (2023). Antioxidant and antimicrobial effects of baby leaves of *Amaranthus tricolor* L. harvested as vegetable in correlation with their phytochemical composition. *Molecules*, 28(4), 1463.
- Temple, N. J. (2022). A rational definition for functional foods: a perspective. *Frontiers in Nutrition*, 9, 957516.
- Thiyajai, P., Kawai, D., Koyama, T. (2021). Effective purification procedure of amaranthin from *Amaranthus Celosia argentea* inflorescence. *International Journal of Food Science and Agriculture*, 5(4), 370–375.
- Timoneda, A., Feng, T., Sheehan, H., Walker-Hale, N., Pucker, B., Lopez-Nieves, S., Guo, R., Brockington, S. (2019). The evolution of betalain biosynthesis in Caryophyllales. *New Phytologist*, 224, 71–85.
- Tovar-Pérez, E., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116(2), 437–444.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.
- Tuwalska, D., Starzak, K., Szot, D., Wybraniec, S., Winterhalter, P., Jerz, G. (2014). Semi-synthesis of red beet betacyanin ethyl-esters by esterification. *Challenges of Modern Technology*, 5, 27–31.
- Uruñuela, Ladrón de Guevara Gabriela y Patricia Plunket Nagoda. (2016). Las maquetas de montes-deidades de amaranto del Posclásico ¿una tradición ancestral? *Arqueología mexicana*, Vol. XXIII, No.138. Raíces, pp 40-45, Ciudad de México.

- USDA Foreign Agricultural Service. (2013). National Food Safety Standard for Use of Food Additives. Available online: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=National%20Food%20Safety%20Standard%20for%20Use%20of%20Food%20Additives%20_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_12-4-2013.
- Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., Dornier, M., Reynes, M. (2005). Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*, 60, 3–12.
- Vaňková, R., Wojdyło, A., Doležal, K., Pěňčík, A., Gajdošová, S., Ichnowski, M., Šubrtová, M., Doležalová, H. (2020). Betalain profiles and antioxidant capacity of differently colored *Hylocereus* spp. fruits. *Molecules*, 25(13), 3066.
- Vecchi, B., & Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70(6), 864–870.
- Velasco, Lozano Ana María. (2016). Los cuerpos divinos, el amaranto: comida ritual y cotidiana. *Arqueología mexicana*, Vol. XXIII, No.138. Raíces, Ciudad de México, pp 26-33.
- Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381–412.
- Viant, M.R., Kurland, I.J., Jones, M.R., Dunn, W.B. (2017). How close are we to complete annotation of metabolomes? *Current Opinion in Chemical Biology*, 36, 64–69.
- Villela, F. Samuel L. (2016). El Huauhtli sagrado, los tamales tzoalli entre los nahuas de Guerrero. *Arqueología mexicana*, Vol. XXIII, No.138. Raíces, Ciudad de México, pp. 46-53.
- Von Elbe, J.H. (2001). Betalains. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F3.1.1–F3.1.7.
- Wali, S., Jan, H. A., & Bussmann, R. W. (2019). Quantitative ethnomedicinal study of indigenous medicinal plants used for digestive disorders of Laspur Valley, Chitral, Northern Pakistan. *Ethnobotany Research and Applications*, 18(1), 1-18.

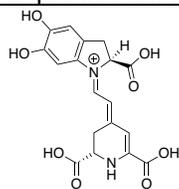
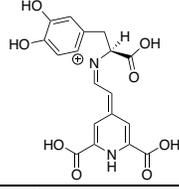
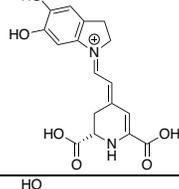
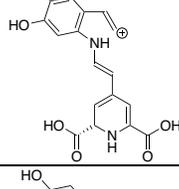
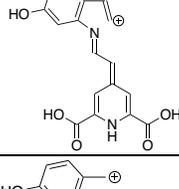
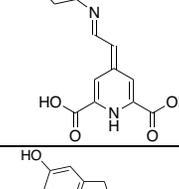
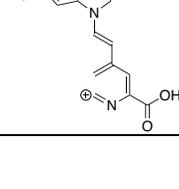
- Wang M, Lopez-Nieves S, Goldman IL, Maeda HA. (2017). Limited tyrosine utilization explains lower betalain contents in yellow than red table beet genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 21, 4305–4313.
- Wang, C., Huang, C., & Lu, Y. (2023). Changes in bio-functional compounds, ACE inhibition, and antioxidant capacity after mixed fermentation of eight whole grains. *Fermentation*, 9(4), 209.
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23.
- Wong, J., Patel, R. A., Kowey, P. R. (2004). The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 47(2), 116–130.
- Wong, Y.M., Siow, L.F. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3086–3092.
- Wu, J.Y., Chen, W.C., Wu, Y.Y., Chen, J.T., Chen, L.G., Chiou, R.Y.Y. (2019). NMR-based elucidation of the positional C6-O-glucopyranosyl substitution of gomphrenin I isolated from *Basella alba* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2, 8–11
- Wybraniec S, Mizrahi Y. (2005). Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6704–12.
- Wybraniec, S. (2005). Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (*Beta vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3483–7.
- Wybraniec, S., Jerz, G., Gebers, N., Winterhalter, P. (2010). Ion-pair high-speed countercurrent chromatography in fractionation of a high-molecular weight variation of acyl-oligosaccharide linked betacyanins from purple bracts of *Bougainvillea glabra*. *Journal of Chromatography B*, 878, 538–550.
- Wybraniec, S., Mizrahi, Y. (2005). Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus*

- polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6704–6712.
- Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mizrahi, Y. (2006). ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Letters*, 47, 1725–1728.
- Wybraniec, S., Stalica, K. (2016). Ion-pair high-speed countercurrent chromatography in fractionation of a high-molecular weight variation of acyl-oligosaccharide linked betacyanins from purple bracts of *Bougainvillea glabra*. *Journal of Chromatography B*, 878, 538–550.
- Wybraniec, S., Stalica, P., Jerz, G., Klose, B., Gebers, N., Winterhalter, P., Spórna, A., Szaleniec, M., Mizrahi, Y. (2009). Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(41), 6890–6899.
- Xie, G. R., & Chen, H. J. (2021). Comprehensive betalain profiling of djulis (*Chenopodium formosanum*) cultivars using HPLC-Q-Orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(51), 15699–15715.
- Xu, X. J., Wang, Z. J., Qin, X. J., Zeng, Q., Chen, S., Qin, Y., Luo, X. D. (2022). Phytochemical and antibacterial constituents of edible globe amaranth flower against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 19(4), e202200139.
- Xu, X., Jiang, Y., Yeo, Q.X., Zhou, W. (2024). Purification and characterization of betacyanin monomers from *Hylocereus polyrhizus* peel: a comparative study of their antioxidant and antidiabetic activities with mechanistic insights. *Food Chemistry*, 451, 139467.
- Yang, Y.-C., Mong, M.-C., Wu, W.-T., Wang, Z.-H., & Yin, M.-C. (2020). Phytochemical profiles and anti-diabetic benefits of two edible *Amaranthus* species. *CyTA - Journal of Food*, 18(1), 94–101.
- Yong, Y.Y., Dykes, G., Lee, S.M., Choo, W.S. (2018). Effect of refrigerated storage on betacyanin composition, antibacterial activity of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and cytotoxicity evaluation of betacyanin-rich extract on normal human cell lines. *LWT - Food Science and Technology*, 91, 491–497.

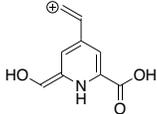
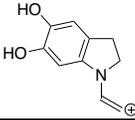
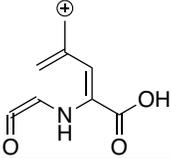
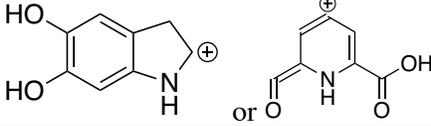
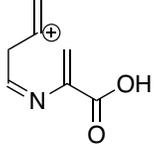
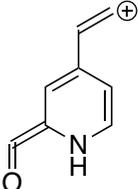
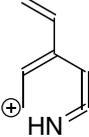
- Zambrano, C., Kerekes, E.B., Kotogán, A., Papp, T., Vágvölgyi, C., Krisch, J., Takó, M. (2019). Antimicrobial activity of grape, apple and pitahaya residue extracts after carbohydrase treatment against food-related bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 416–425.
- Zea Ramos, A.E. (2016). Caracterización sensorial (perfil flash) y nivel de agrado (internal preference mapping) de los quintoniles de las especies *Amaranthus hypochondriacus* L. (Sierra Norte Puebla) y *Amaranthus hybridus* L. (Ciudad de México). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México., México, pp. 6.
- Zhao, D., Derkx, A. P., Liu, D. C., Buchner, P., Hawkesford, M. J. (2015). Overexpression of a NAC transcription factor delays leaf senescence and increases grain nitrogen concentration in wheat. *Plant Biology*, 17(4), 904–913.
- Zhu, F. (2023). Amaranth proteins and peptides: biological properties and food uses. *Food Research International*, 164, 112405.

ANEXO I

Anexo I. Iones comunes observados en posibles señales de betalaínas por colisión con HCD a 50 eV con abundancia relativa mayor a 5%.

Señal	<i>m/z</i>	Estructura química del fragmento
1	389.09	 <p>Chemical structure of betanin radical cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is radical cationic.</p>
2	387.07	 <p>Chemical structure of betanin cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is cationic.</p>
3	345.10	 <p>Chemical structure of betanin radical cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is radical cationic.</p>
4	343.09	 <p>Chemical structure of betanin cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is cationic.</p>
5	341.07	 <p>Chemical structure of betanin radical cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is radical cationic.</p>
6	313.08	 <p>Chemical structure of betanin radical cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is radical cationic.</p>
7	299.10	 <p>Chemical structure of betanin radical cation, showing a 5-hydroxytryptophan residue linked to a pyridine ring with two carboxylic acid groups. The nitrogen atom of the tryptophan ring is radical cationic.</p>

8	297.08	
9	281.09	
10	269.09	
11	255.11	
12	255.08	
13	253.09	
14	211.07	
15	194.04	
16	179.08	

17	178.05	
18	176.07	
19	166.05	
20	150.05	
21	138.05	
22	132.04	
23	106.06	

ANEXO II

Anexo II. Datos cromatográficos y espectrométricos para las betalaínas observadas en el extracto de *Beta vulgaris*.

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
1	Ácido betalámico	3.23	0.94	C ₉ H ₉ NO ₅	212.0553	212.0545	-3.77	194.04, 166.05, 148.04, 138.05, 120.04, 106.03
Betaninas								
2	Prebetanina	3.19	0.93	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₆ S	631.1076	631.1052	-3.8	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
3	Betanina	3.43	1	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1483	-4.54	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
4	Betanidina	3.44	1	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₈	389.0979	389.0964	-3.86	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
5	2-descarboxi-2,3-dehidro-betanina (2-decarboxyxanbetanina)	3.62	1.06	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1429	-4.75	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
6	17-descarboxi-betanina	5.83	1.7	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1591	-3.55	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
7	Isoprebetanina	6.01	1.75	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₆ S	631.1076	631.1047	-4.6	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
8	Isobetanina	6.59	1.92	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.1508	551.1481	-4.9	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
9	2-descarboxi-2,3-dehidro-isobetanina (2-decarboxyisoxanbetanina)	6.6	1.92	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1433	-3.96	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
10	2,17-bidescarboxi-2,3-dehidro-betanina (2,17-bidescarboxyxanbetanina)	7.61	2.22	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461.1555	461.1534	-4.55	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
11	17-descarboxi-isobetanina	7.69	2.24	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1587	-4.34	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06

Anexo II. (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
12	Phyllocactina	7.71	2.25	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₁₆	637.1512	637.1497	-2.35	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
13	17-descarboxi-phyllactina	8.01	2.34	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1591	-3.71	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
14	15-descarboxi-betanina	8.29	2.42	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1591	-3.55	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
15	Neobetanina	8.31	2.42	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₃	549.1351	549.1336	-2.73	387.07, 341.07, 313.08, 299.10, 299.06, 287.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 132.04, 106.06
16	17-descarboxi-neobetanina	8.39	2.45	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	505.1453	505.1438	-2.97	343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.08, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
17	Isophyllocactina	8.46	2.47	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₁₆	637.1512	637.1491	-3.3	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
18	2-descarboxi-betanina	8.83	2.57	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₁₁	507.1609	507.1596	-2.56	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
19	17-descarboxi-isophyllocactina	9.21	2.69	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₄	593.1613	593.1588	-4.21	345.10, 299.10, 297.08, 281.09, 255.11, 253.09, 194.04, 178.05, 176.07, 150.05, 138.05, 132.04, 106.06
20	2-descarboxi-2,3-dehidro-neobetanina	10.06	2.93	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₁₁	503.1296	503.1277	-3.78	341.07, 327.06, 313.08, 295.07, 277.07, 267.07, 253.06, 251.08, 221.07, 195.09, 132.04, 106.06
21	2,17-bi descarboxi-2,3-dehidro-neobetanina	11.14	3.25	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₉	459.1398	459.1383	-3.27	297.08, 269.09, 251.08, 223.08, 195.09, 133.08
22	Lampranthin II	11.01	3.21	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1981	727.1956	-3.44	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
23	Isolampranthin II	11.34	3.31	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.1981	727.1948	-4.54	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6

Anexo II. (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	<i>m/z</i> teórico [M+H] ⁺	<i>m/z</i> observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Melocactinas								
24	Melocactina	4.81	1.4	C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	713.2036	713.2005	-4.35	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
25	Isomelocactina	7.18	2.09	C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₁₈	713.2036	713.2009	-3.79	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6
Apiocactinas								
26	2'-O-apiosil-phyllocactina	8.31	2.42	C ₃₂ H ₃₆ N ₂ O ₂₀	769.1934	769.1912	-2.86	389.09, 345.10, 343.09, 299.10, 297.08, 281.09, 269.09, 255.11, 253.09, 194.04, 166.05, 178.05, 176.07, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 106.6

Anexo II. (continuación)

#	Compuesto	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Formula Química	m/z teórico [M+H] ⁺	m/z observado [M+H] ⁺	Exactitud de masa (ppm)	Fragmentos
Betaxantinas								
Con carga positiva								
27	Histamina-bx	9.04	2.64	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄	305.1244	305.1232	-3.93	287.12, 261.13, 256.89, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
Polares sin carga								
28	Glutamina-bx	1.2	0.35	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	340.1139	340.1129	-2.94	323.08, 277.08, 249.08, 233.09, 231.07, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
29	Treonina-bx	1.52	0.44	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₇	313.103	313.1022	-2.56	269.09, 267.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
30	Serina-bx	4.77	1.39	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₇	299.0874	299.0861	-4.35	255.09, 253.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
Hidrofóbicas								
31	Alanina-bx	2.02	0.59	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆	283.0925	283.0915	-3.53	237.08, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
32	Prolina-bx	3.04	0.89	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	309.1081	309.1068	-4.21	265.11, 263.10, 235.1, 219.11, 217.09, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
33	Glicina-bx	6.49	1.89	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₆	269.0768	269.0758	-3.72	331.12, 239.11, 285.12, 283.10, 239.11, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
34	Valina-bx	7.97	2.32	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	311.1238	311.1229	-2.89	267.13, 265.11, 237.12, 221.12, 219.11, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
35	Isoleucina-bx	9.87	2.88	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	325.1394	325.1384	-3.08	279.13, 251.13, 235.14, 233.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
36	Leucina-bx	10.01	2.92	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	325.1394	325.1385	-2.77	281.14, 279.13, 251.13, 235.14, 233.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
37	Triptofano-bx	10.12	2.95	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₆	398.1347	398.1331	-4.02	269.07, 223.07, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
38	Fenilalanina-bx	10.15	2.96	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆	359.1238	359.1225	-3.62	315.13, 313.11, 269.12, 267.11, 223.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06
Casos especiales								
39	Sulfóxido de metionina-bx	10.09	2.94	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₇ S	359.0907	359.0892	-4.18	267.11, 223.12, 211.07, 194.04, 166.05, 150.05, 138.05, 132.04, 130.05, 106.06