

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE PÉPTIDOS
DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) AÑADIDOS A
PASTA DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) CON ALTO CONTENIDO
DE PROTEÍNA OBTENIDOS MEDIANTE LA HIDRÓLISIS CON
ALCALASA EN UN MODELO MURINO**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Eduardo Enrique Valdez Meza

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a septiembre de 2019.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE PÉPTIDOS DE AMARANTO
(*Amaranthus hypochondriacus* L.) AÑADIDOS A PASTA DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
CON ALTO CONTENIDO DE PROTEÍNA OBTENIDOS MEDIANTE LA HIDRÓLISIS CON
ALCALASA EN UN MODELO MURINO , en los sucesivo LA OBRA, realizada como
trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestro en
Ciencias , en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para
que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución
pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con
fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la
universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito
correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en
general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo
a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o
cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA



Nombre y Firma del Autor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por su contribución a mi formación académica y personal al abrir sus puertas a personas de lugares distantes.

A conacyt y al proyecto profapi 2015, por su apoyo y permitir acceder a sus convocatorias.

De manera personal y con afecto a mis directores Francisco Cabrera Chávez y Guadalupe Miroslava Suarez Jiménez por su contribución en cada uno de los momentos que fue necesario aclarar todas mis dudas y su apoyo académico y personal.

De manera especial A mis padres y mis hermanos por su amor y apoyo incondicional en cada momento de mi vida desde mí primer pasó hasta los que me hicieron llegar a este punto de mi formación profesional. A mi familia en general por ser parte importante de mis impulsos en seguir adelante. A mi Novia Saraí por su amor comprensión y apoyarme en cada momento que necesito de ayuda. De igual manera a mis compañeros de maestría por su amistad y apoyo durante mi estadía en la ciudad de Hermosillo y como olvidar a Coty por estar siempre pendiente de todos y ser la mama por excelencia del DIPA.

A todos los que conforman este gran departamento DIPA y a la Universidad de Lisboa por abrir sus puertas para el desarrollo de mi estadía académica.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis, todo esfuerzo y todo su conocimiento generado a mi familia, en especial a mis padres, ya que gracias a ellos y cada gota de su sudor me formaron e impulsaron en prepararme y enseñarme el sentido de la vida. La vida es para los atrevidos y en ese sentido mis atrevimientos son para y por mis padres y los míos.

RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es un problema de salud pública importante definido como una presión sanguínea $\geq 140/90$. Uno de sus tratamientos se basa en la terapia farmacológica mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-1). Al igual que los fármacos existen algunos péptidos derivados de proteínas como las del amaranto que exhiben esta característica cuando son derivados de la hidrólisis con la enzima alcalasa en condiciones optimizadas. Estos péptidos podrían ser útiles para el desarrollo de alimentos funcionales. Por otro lado, la biodisponibilidad de los péptidos antihipertensivos depende de varias características de las matrices alimentarias que los contienen y las interacciones de estos con los componentes de dichas matrices. El objetivo general de la presente investigación fue evaluar las propiedades tecnológicas, sensoriales y antihipertensivas de pastas con distintos contenidos de proteína y enriquecidas con un hidrolizado proteico de amaranto. Se formularon pastas con 11% (A; control), 15% (B) y 20% (C) de contenido proteico. Se obtuvo un hidrolizado proteico de amaranto con alcalasa en condiciones optimizadas previamente establecidas. Se determinó el IC₅₀ del hidrolizado proteico; se evaluaron el tiempo de cocción, la pérdida de sólidos y ganancia de peso durante esta, el color y la textura de las muestras de pasta ya cocidas. Adicionalmente se realizó un análisis sensorial donde un panel no entrenado evaluó los atributos sensoriales y se realizó una prueba discriminatoria para determinar si las muestras de pastas eran distinguibles entre sí. El efecto antihipertensivo se evaluó en ratas espontáneamente hipertensas midiéndoles la presión arterial sistólica durante 9 h

posteriores a la suplementación con la pasta. Como resultado se obtuvo que el hidrolizado IC50 fue de 0.014 mg / mL. El tiempo óptimo de cocción y la pérdida de sólidos disminuyeron en los productos B y C vs. A ($p < 0.05$). En la prueba de color los valores de L^* disminuyeron en la pasta C comparados con las muestras de pasta A y B. La firmeza fue mayor en la pasta C que en la pasta A ($p < 0.05$). La adhesividad fue mayor en la pasta A que en las pastas B y C ($p < 0.05$). La pasta A tuvo la mayor aceptabilidad ($p < 0.05$), sin embargo, no se encontraron diferencias entre los atributos de sensoriales evaluados en las distintas muestras de pasta. Las pastas B y C y el captopril mostraron propiedades antihipertensivas después de 3 h de suplementación ($p < 0.05$). Este efecto permaneció después de 7, 8 y 9 h respectivamente, evidenciando que el efecto antihipertensivo puede prolongarse con el aumento del contenido proteico de las pastas. Con estos resultados se puede concluir que la adición de hidrolizados de amaranto a pastas alimenticias no impacta negativamente en los atributos sensoriales, aunque la aceptabilidad general puede ser mejorable. Es posible mantener las propiedades antihipertensivas de la pasta suplementada en condiciones fisiológicas. El incremento del contenido proteico de las pastas prolonga el efecto antihipertensivo de las mismas.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Hipertensión Arterial	3
Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	4
Péptidos Bioactivos.....	6
Fuentes de Péptidos Antihipertensivos.....	8
Digestión y Absorción de Péptidos Antihipertensivos.....	9
Efecto de las Matrices Alimentarias sobre la Biodisponibilidad de Péptidos Antihipertensivos.....	11
Amaranto como Fuente de Péptidos Antihipertensivos	12
Incorporación de Péptidos Antihipertensivos a Matrices Alimentarias	14
HIPÓTESIS	19
Objetivo General	20
Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Muestras de Amaranto.....	23
Cuantificación de Proteína de Materias Primas.....	23
Obtención de Péptidos Antihipertensivos de Amaranto Mediante la Hidrólisis con Alcalasa	23
Capacidad Inhibitoria Media sobre la ECA-1 (IC50).....	24
Formulación de Pastas a Base de Trigo con Diferentes Concentraciones de Proteína	24
Adición de Hidrolizado Proteico de Amaranto a Pastas de Trigo	27
Evaluación de las Características Tecnológicas de las Pastas	27

Análisis Proximal.....	28
Análisis Sensorial.....	29
Evaluación del Efecto Antihipertensivos de Hidrolizado Proteico de Amaranto con Alcalasa Adicionados a Pastas de Trigo y Suministrados a Ratas Espontáneamente Hipertensas.....	30
RESULTADOS.....	31
Cuantificación de Proteínas de Materias Primas	31
Obtención de Péptidos Antihipertensivos de Amaranto Mediante la Hidrólisis con Alcalasa	31
Capacidad inhibitoria media sobre la ECA-1 (IC50)	31
Evaluación de las Características Tecnológicas de las Pastas	34
Calidad de Cocción	34
Textura	36
Color.....	38
Análisis Proximal.....	40
Análisis Sensorial.....	42
Evaluación del Efecto Antihipertensivo en Ratas Espontáneamente Hipertensas	45
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	48
PRODUCTIVIDAD.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación gráfica del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona RAA.....	5
2	Esquema metodológico de la obtención y evaluación de biodisponibilidad de péptidos antihipertensivos de amaranto ..	22
3	Determinación <i>del grado de inhibición de la ECA-1</i> , en condiciones optimizadas de hidrolizado: pH 7,01; temperatura 52 ° C; concentración de enzima 0,04 mU / mg de proteína; tiempo de reacción 6,16 h). ACE-1: enzima convertidora de angiotensina-1 utilizando el kit WST-Dojindo Molecular Technologies.....	33
4	Atributos sensoriales descriptivos para pastas control (a), y pastas experimentales B y C.....	43
5	Prueba triangular de tipo discriminatoria para cada una de las secuencias asignadas a los panelistas.....	44
6	Presión arterial sistolica en ratas espontaneamente hipertensas despues de la suplementacion con 3 tipos de pasta y control positivo captopril	46

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales productos alimenticios comercializados que contienen péptidos antihipertensivos en su composición	16
2	Formulaciones usadas para la elaboración de pastas con modificaciones en su contenido de proteína elaboradas de acuerdo al método 66-42.01 AACCI	26
3	Características de calidad de cocción de la pasta de sémola con diferentes concentraciones de proteínas y péptidos antihipertensivos en su formulación	35
4	Características de textura de pastas de trigo y pastas de trigo con semolina y amaranto	37
5	Cambios de color de la pasta de sémola y la mezcla de harina de sémola y amaranto en diferentes etapas de procesamiento....	39
6	Análisis de composición química de pastas de trigo y pastas de trigo y pastas de trigo con semolina y amaranto.....	41

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es un problema de salud pública que afecta aproximadamente al 25% de la población adulta, y se puede definir como una presión sanguínea $\geq 140/90$ (OMS., 2005; Barquera *et al.*, 2010). Adicionalmente el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) publicó que en México se gastan anualmente cerca de 90 mil millones de pesos (MXN) en problemas relacionados con HTA (Contreras-Loya., 2012). En este sentido las personas que padecen de HTA son propensas al desarrollo de otras enfermedades cardiovasculares como la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares y la enfermedad renal. Existen algunos factores que predisponen a poblaciones al desarrollo de la HTA como la obesidad, tabaquismo y la disposición genética (Poma *et al.*, 2018). Comúnmente la HTA puede ser controlada con hábitos alimentarios, el ejercicio regular y la reducción del sodio en la dieta, sin embargo, en la mayoría de los casos se recurre al tratamiento farmacológico.

Comúnmente los fármacos utilizados para el tratamiento de la HTA tienen la capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA-1) la cual es una enzima clave en el control de la presión arterial dentro del sistema renina angiotensina aldosterona (RAA). Particularmente, algunas secuencias peptídicas del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) han exhibido capacidad para inhibir a la (ECA-1) y reducir la presión arterial en estudios *in vitro* e *in vivo* destacando los péptidos generados tras su hidrólisis con alcalasa (Tovar-Perez *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2011, Ramírez-Torres *et al.*, 2017) e incluso mostrando mejores resultados que péptidos de origen animal (Martínez-Maqueda *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha identificado que algunos péptidos con capacidad de inhibir a la ECA-1 aumentan su biodisponibilidad si están inmersos en una matriz alimentaria rica en proteínas, esto debido a un vaciamiento gástrico retardado y disminución en la velocidad de absorción de péptidos (Ten Have *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, las evaluaciones de la adición de hidrolizados proteicos con efecto antihipertensivo a matrices alimentarias

son limitadas. De este modo es relevante que las investigaciones y ensayos se encuentren orientados a las interacciones que puedan mantener con otros componentes del alimento dentro de una matriz alimentaria, así como el efecto que pueden ejercer sobre sus características tecnológicas y atributos sensoriales. De tal manera que el evaluar la adición de hidrolizados proteicos de amaranto con capacidad antihipertensiva es importante para el diseño de matrices alimentarias que contengan péptidos con actividad inhibitoria sobre la ECA-1, de este modo se justifican estudios para evaluar su uso como ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales.

ANTECEDENTES

Hipertensión Arterial

La HTA se define como una presión sanguínea mayor que 140/90 mmHg. La prevalencia de esta enfermedad en México afecta a más del 25% de la población adulta y aproximadamente un 40% desconoce padecerla según la última encuesta nacional de salud (ENSANUT, 2016). En el 2013 el Instituto Nacional de Salud Pública informó que en México se desembolsan aproximadamente cada año 6536 MDD en problemas de salud relacionados con la HTA. Además, la HTA es un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas como: la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular y enfermedades renales (Faradonbeh *et al.*, 2018). El tipo más común de hipertensión corresponde al tipo 1 (90-95% de los casos) y su origen no se encuentra bien esclarecido. Particularmente este tipo de HTA puede ser controlado principalmente con la administración de fármacos y como medidas complementarias cambios en el estilo de vida, la reducción de sodio en la dieta y la práctica de ejercicio regular (Sutton *et al.*, 2018).

La terapia farmacológica para el control de HTA se encuentra orientada al uso de diuréticos, vasodilatadores, bloqueadores de los receptores de angiotensina II e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina ECA-1 principalmente (Taddei, 2015). Sin embargo, las terapias farmacológicas se han encontrada asociadas al desarrollo de efectos no deseados tras su administración (Rydberg *et al.*, 2018). Por ejemplo, Cooper *et al.*, (2006) alertaron que el uso de fármacos inhibidores de la ECA-1 como es el caso de enalapril, captopril, y lisonopril generan un sabor amargo en la boca, tos y resequedad. En el mismo sentido, pueden inducir a malformaciones congénitas si estos son administrados durante el primer semestre de embarazo debido a que estos fármacos tienen la capacidad de atravesar la placenta y disminuir el flujo útero-placentario (Abboud *et al.*, 2004). Aunado a lo

anterior, surge el interés por identificar terapias alternativas para el control de la HTA. En la última década se ha identificado que algunos péptidos de amaranto han exhibido capacidad para inhibir a la ECA-1, enzima clave para la regulación de la presión arterial con participación en el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

El sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA) representa la principal ruta para el control de la presión arterial. Este sistema consiste en una cascada de reacciones biológicas con el objetivo de regular la presión arterial (Ferrario & Mullick, 2017). En este proceso se libera una pro-hormona de origen hepático denominada angiotensinógeno a la cual le es eliminado su grupo N-terminal por acción de la enzima renina dando origen a un decapeptido llamado angiotensina I (Ang-1), la Ang-1 es el sustrato para la ECA-1, de este modo la ECA-1 elimina el dipéptido HL del grupo C-terminal de Ang-1 dando origen al péptido angiotensina II (Ang II). Siendo este un potente vasoconstrictor que actúa directamente sobre las células musculares lisas vasculares, situación que provoca la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales promoviendo una reabsorción de agua y sal promoviendo el aumento de la presión arterial (Quiroga *et al.*, 2017). En este entendido, la inhibición de ECA-1 conlleva a una producción pobre de angiotensina II generando una menor vasoconstricción de este modo resultando una reducción de la HTA. El sistema RAA se muestra a mayor detalle en la figura 1.

Además de la inhibición de la ECA-1 existen otros mecanismos dentro del sistema RAA con la capacidad de reducir la HTA. Por ejemplo: Precusores en la producción de óxido nítrico, la inhibición de la renina, los bloqueadores de los receptores AT-II, la vía de la bradiquinina, el bloqueo de los canales de calcio y la inhibición del receptor de angiotensina (Chibuike *et al.*, 2014). En este contexto existe una considerable cantidad de estudios donde se exhibe que algunos péptidos de origen alimentario mantienen la capacidad de disminuir la HTA en diferentes etapas del sistema RAA (Aluko., 2015; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*; 2017).

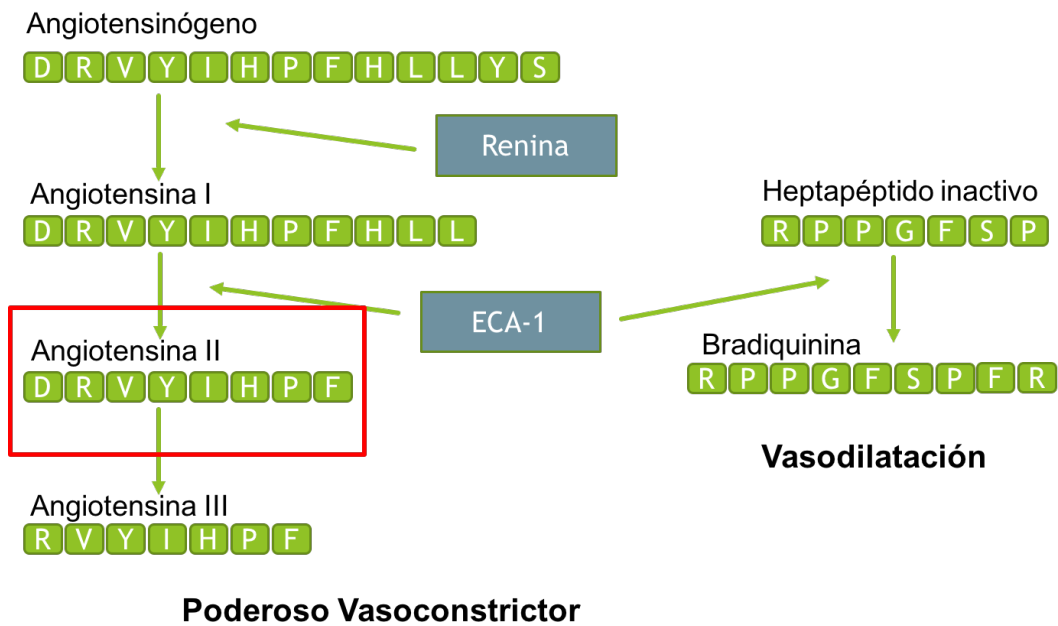


Figura 1. Representación gráfica del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona RAA. Adaptado de (Torruco-Uco *et al.*, 2008).

Sin embargo, el desarrollo de este tipo de evaluaciones se enfrenta a algunas limitaciones: los costos de los estudios son relativamente más altos, existe una menor cantidad de reactivos disponibles y algunas enzimas implicadas presentan un grado de inhibición menor en comparación con la ECA-1 (Aluko., 2015). Dado a lo anterior los estudios de inhibición de ECA-1 son el modelo por excelencia para la evaluación de péptidos bioactivos con capacidad antihipertensiva.

Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos se pueden considerar moléculas que tienen la capacidad de unirse a objetivos fisiológicos para efectuar diversos procesos de señalización. Comúnmente los péptidos bioactivos se encuentran dentro de estructuras proteicas de origen animal o vegetal en donde pueden permanecer inactivos y ser liberados durante la digestión gastrointestinal o diversos procesamientos tecnológicos como la hidrólisis enzimática, entre otros y de esta manera pasar a su forma bioactiva.

Algunas de las principales fuentes de péptidos bioactivos son: las caseínas, el suero de la leche, leche fermentada, músculo de pollo, gluten del trigo, soya, girasol, amaranto entre otras (Quiroga *et al.* 2017; Fritz *et al.*, 2011; Aluko, 2015). Los péptidos bioactivos pueden exhibir diversas actividades biológicas y pueden actuar como: inmunomoduladores, opioides, antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, antihipertensivos entre otros. Actualmente existe un gran interés en el estudio de estos compuestos, además suelen ser un gran atractivo para la industria alimentaria debido a que pueden ser incluidos en diversos sistemas alimenticios, ser comercializados y lograr su efecto biológico en el consumidor final (Dziuba y Dziuba, 2014). En este sentido, toman gran relevancia aquellos con capacidad antihipertensiva debido a la alta prevalencia de la HTA, aunado a los efectos secundarios de la terapia farmacológica y los resultados prometedores que algunos péptidos antihipertensivos han ejercido sobre la inhibición de la ECA-1.

Características de los Péptidos Antihipertensivos

Regularmente los péptidos antihipertensivos contienen residuos cortos de 2 a 12 aminoácidos (Natesh *et al.*, 2004) esto es debido a que la ECA-1 no puede ligar a péptidos con un tamaño superior y se limita generalmente a di, tri y tetrapéptidos (Wu *et al.*, 2017). También se ha resaltado la importancia de los tres últimos residuos de aminoácidos en el grupo C-terminal de las secuencias peptídicas con capacidad antihipertensiva. Se ha observado que la ECA-1 prefiere unirse a residuos de aminoácidos hidrofóbicos (cadenas laterales aromáticas o ramificadas) Tyr, Phe, Trp y / o Pro en las posiciones C-terminales. En el mismo sentido gran parte de estos péptidos presentan un residuo de Pro en la penúltima posición de la molécula del grupo C-terminal (Wu *et al.*, 2017). Otros estudios han identificado secuencias de aminoácidos de carga positiva como Lys y Arg que pueden disminuir el efecto sobre la inhibición de la ECA-1 (L'Vov y Sadykov 1999). Sin embargo, las condiciones mencionadas anteriormente no son una regla general para establecer que los péptidos antihipertensivos deben su actividad a la presencia de estos aminoácidos (Aluko, 2015).

Adicionalmente a la inhibición de la ECA-1, existen otros sistemas mediante los cuales los péptidos antihipertensivos pueden disminuir la HTA. Recientemente Quiroga *et al.*, (2017) realizaron un análisis de diversos mecanismos que pueden disminuir la presión arterial en modelos *in vitro*, *in vivo* y en pocos casos mediante ensayos clínicos e identificó que los sistemas que regulan la presión arterial actúan en sinergia. Cabe destacar que la inhibición de la ECA-1 es el más eficaz y el modelo tomado por excelencia para las evaluaciones de compuestos con capacidad antihipertensiva, esto es derivado a que la inhibición de la ECA-1 produce una disminución de la HTA más eficiente en relación con los generados mediante la inhibición de otras enzimas o bloqueadores de receptores específicos dentro del sistema RAA. Adicionalmente, la cantidad de reactivos disponibles para la evaluación de la inhibición de la ECA-1 son comercializados en mayor medida (Aluko., 2015). De tal forma que la mayoría de los estudios de péptidos con

capacidad antihipertensiva se han centralizado en la inhibición de la ECA-1 en ensayos *in vitro*, *in vivo* y en menor medida ensayos clínicos.

Gran parte de las investigaciones de los péptidos antihipertensivos se han concentrado en los tripéptidos (VPP e IPP) comúnmente generados tras la fermentación de productos lácteos con microorganismos como *Lactobacillus casei* que han demostrado disminuir la presión arterial en humanos (Fujita *et al.* 2001), y en yogurt que contiene péptidos a partir de caseínas hidrolizadas con actividad antihipertensiva (Martinez-Maqueda *et al.*, 2012). Sin embargo, estos péptidos no exhiben la mejor capacidad de inhibición sobre la ECA-1 (IC50) según BIOPEP (Puchalska *et al.*, 2015), lo que pone en evidencia que probablemente los péptidos con mayor capacidad antihipertensiva aún no han sido estudiados al ser contenidos como parte de la composición de matrices alimentarias.

Fuentes de Péptidos Antihipertensivos

Los péptidos antihipertensivos mantienen un origen en productos tanto de fuentes animales como vegetales. Del total de péptidos antihipertensivos evaluados en modelos murinos 47 de ellos son derivados de las proteínas de leche, 10 derivados de proteína de huevo, 40 son derivados de otras proteínas de origen animal y 42 de origen vegetal como el guisante, ajo, arroz, frijol, soya, trigo y amaranto (Martinez-Maqueda *et al.*, 2012; Udenigwe y Aluko 2012). Referente a los estudios en humanos, se ha concentrado en el estudio de los tripéptidos IPP y VPP, los cuales ya han sido administrados en diferentes fórmulas de leche fermentadas, jugo de frutas, productos secos entre otros (Kurosawa *et al.*, 2011). Es importante destacar que los péptidos que actualmente se encuentran disponibles y se utilizan como ingredientes nutraceúticos para alimentos funcionales derivan de caseínas de leche de vaca (Martinez-Maqueda *et al.*, 2012; Minkiewicz *et al.*, 2011; Cicero & Borghi., 2013). De hecho, recientemente se ha publicado que existen 5 productos antihipertensivos de origen lácteo y solo 2 de ellos son de grado alimenticio (Dziuba y Dziuba., 2014).

Adicionalmente se han realizado diversos estudios enfocados a evaluar la capacidad de inhibición de la ECA-1 o su efecto sobre la presión arterial de péptidos de origen vegetal, pero en la mayoría de los casos tales péptidos solo se han realizado mediante estudios *in vitro*, en menor cantidad ensayos *in vivo* y se han dejado de lado las evaluaciones de biodisponibilidad (Martinez-Maqueda *et al.*, 2012; Ramírez-Torres *et al.*, 2017, Garcia-Mora *et al.*, 2014). Es importante destacar que algunos de los péptidos antihipertensivos de origen vegetal han mantenido resultados prometedores en la disminución de la presión arterial e inhibición de la ECA-1, incluso algunos péptidos o aislados proteicos con mejores resultados que los de origen animal (Martinez-Maqueda *et al.*, 2012; Fritz *et al.*, 2011; Ramírez-Torres *et al.* 2017; Aluko., 2015).

Actualmente existen pocos estudios en modelos animales que demuestren la eficacia de hidrolizados proteicos de amaranto sobre la presión arterial, y más aún aquellos relacionados cuando estos están contenidos en una matriz alimentaria, esta situación podría generar cambios relacionados con su digestión o absorción. En este sentido las evaluaciones del efecto de hidrolizados proteicos sobre la presión arterial pueden contribuir al mejoramiento y posterior comercialización de este tipo de productos alimenticios.

Digestión y Absorción de Péptidos Antihipertensivos

Las propiedades bioactivas de los péptidos son dependientes de su composición y la secuencia de aminoácidos que lo conformen. Sin embargo, el patrón de aminoácidos de los péptidos derivados de los alimentos es generado por la especificidad de enzimas gastrointestinales y esto podría limitar la bioaccesibilidad de secuencias peptídicas específicas funcionales (Cian *et al.*, 2015).

La digestión de proteínas y péptidos comienza en el estómago por la acción de pepsinas y el pH ácido. En este espacio la condición ácida desnaturaliza y despliega

proteínas aumentando la disponibilidad para la hidrólisis por la acción de la pepsina gástrica. Esta enzima ataca preferentemente los enlaces peptídicos que implican aminoácidos aromáticos hidrofóbicos, es decir, fenilalanina y triptófano. Los polipéptidos resultantes se someten a una hidrólisis adicional generadas por las enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasas) las cuales mantienen diferente especificidad sobre los enlaces peptídicos. Este proceso genera polipéptidos y aminoácidos a nivel intestinal. Posteriormente, la hidrólisis de enlaces peptídicos adicionales está mediada por peptidasas presentes en el epitelio intestinal específicamente en la frontera de cepillo que dan como resultados péptidos bioaccesibles (Kholmeier., 2015). Estos péptidos podrían volverse biodisponibles ya sea en una forma intacta o biotransformados en péptidos más pequeños con bioactividad aumentada o reducida. Las peptidasas del plasma contribuyen adicionalmente a la hidrólisis de péptidos limitando la vida plasmática de los mismos (Vermeirssen *et al.*, 2004). Por tanto, para ser fisiológicamente relevantes, cuando se usan como nutracéuticos o ingredientes de alimentos funcionales, los péptidos bioactivos derivados de alimentos deben ser resistentes a la digestión o suministrados en su forma bioactiva en sitios específicos del tracto gastrointestinal.

El transporte de péptidos, a través del intestino delgado, puede ser llevado a cabo por diferentes mecanismos. Pequeños compuestos hidrofílicos podrían permear la mucosa intestinal a través de la vía paracelular. Los di- y tri-péptidos neutros y cargados positivamente son permeados preferentemente a través de esta ruta. Los péptidos más largos, es decir, de seis aminoácidos (con un peso molecular de alrededor de 620 Daltons), son menos propensos a permear y esto es independiente de su carga neta (Pauletti *et al.* 1997). La ruta transcelular depende también del tamaño, pero es más probable que penetren los péptidos hidrófobos en parte debido a la naturaleza lipofílica de las membranas celulares (Wada & Lonnerdal 2014). Por otra parte, la proteína transmembranal denominada transportador de péptidos 1 (PepT1), que se encuentra en el borde del cepillo del intestino, puede transportar di- y tri-péptidos dentro del enterocito. Se cree que este mecanismo es

independiente de la carga neta de los péptidos y de las propiedades lipofílicas o hidrofílicas (Freeman, 2015). En general, la longitud del péptido (tamaño) parece más relevante que otras propiedades fisicoquímicas para el transporte de péptidos a través de la mucosa intestinal. Así, después de la administración oral o intragástrica, los péptidos bioactivos cortos (longitud de 3-5 aminoácidos) son los que alcanzan la circulación sistémica. Más allá de la resistencia a la digestión de algunos péptidos antihipertensivos, las matrices alimentarias podrían desempeñar un papel importante aumentando o reduciendo la bioaccesibilidad y / o la biodisponibilidad de los péptidos. Esto es particularmente relevante cuando estos compuestos están destinados a ser utilizados como ingredientes para la producción de alimentos funcionales.

Efecto de las Matrices Alimentarias sobre la Biodisponibilidad de Péptidos Antihipertensivos

Una definición común de biodisponibilidad de un nutriente es la cantidad que se absorbe de la dieta y se utiliza para las funciones normales del cuerpo (Aggett, 2010). Para los péptidos antihipertensivos, la biodisponibilidad puede ser definida como la cantidad y la velocidad con la que pueden ser absorbidos. La biodisponibilidad y la bioaccesibilidad son relevantes al evaluar péptidos antihipertensivos inmersos en matrices alimentarias.

La biodisponibilidad de péptidos podría disminuir dependiendo de la interacción con macromoléculas y / o la matriz de alimentos. Estas interacciones varían, ya que las magnitudes de la distancia en la estructura de la matriz alimentaria también varían. Por ejemplo, la interacción entre moléculas bioactivas y macromoléculas en matrices de alimentos van de 10 a 100 nanómetros (Parada & Aguilera 2007), mientras que la interacción entre los compuestos bioactivos y la matriz alimentaria entera, por ejemplo, componentes fenólicos y componentes de la matriz alimentaria es de 100 micrómetros (Balasundram *et al.*, 2006).

Ten Have *et al.*, (2015) informaron que la biodisponibilidad de los péptidos antihipertensivos XPP se prolonga si están incrustados en una matriz proteica, mientras que en una matriz de macronutrientes completos los péptidos están más disponibles, pero con un porcentaje bajo. La secuencia XPP se ha descrito para los péptidos antihipertensivos IPP y VPP (Gleeson *et al.*, 2017; Rutella *et al.*, 2016). Esto es debido a que la matriz proteica mejora la biodisponibilidad al prolongar la absorción intestinal debido a un vaciamiento estomacal retardado. Sin embargo, otros factores podrían disminuir la liberación de péptidos de la matriz alimenticia durante la digestión gástrica, por ejemplo, las interacciones hidrofóbicas (Mandalari *et al.*, 2014). Por lo tanto, se puede considerar que estos hallazgos destacan que los péptidos antihipertensivos pueden ser bioaccesibles cuando son ingeridos en matrices de alimentos como parte del tratamiento dietético y esto fomenta el diseño de matrices de alimentos para alimentos funcionales con propiedades antihipertensivas.

Amaranto como Fuente de Péptidos Antihipertensivos

Las propiedades inhibitorias de péptidos del amaranto sobre la ECA-1 y su efecto sobre la presión arterial ha sido ampliamente reportada (Quiroga *et al.*, 2017; Tovar-Perez *et al.*, 2009; Ramírez-Torres *et al.*, 2017; Fritz *et al.*, 2011; Velarde-Salcedo *et al.*, 2013). Uno de los primeros estudios para identificar péptidos de amaranto capaces de inhibir la ECA-1 fue realizado por Vecchi y Añon en el (2009), el estudio consistió en identificar en una base *in silico* de una biblioteca de péptidos la construcción de un modelo tri-dimensional de la globulina 11s de amaranto, uno de los principales constituyentes de la semilla de amaranto, en este modelo se identificaron un par de tripéptidos y tetrapéptidos (IKP y LEP) (ALEP y VIKP) como potenciales inhibidores de la ECA-1, los cuales fueron evaluados *in vitro* mostrando una alta capacidad de inhibición. Simultáneamente se identificaron péptidos inhibidores de la ECA-1 en albúminas y globulinas 11s de amaranto, en este estudio una hidrólisis con la enzima alcalasa generó un porcentaje de inhibición de la ECA-

1 entre el 40 y 35% exhibiendo un punto máximo de inhibición después de 18 y 15 horas de hidrólisis en ambas fracciones (Tovar-Perez *et al.*, 2009).

Posteriormente Fritz *et al.*, (2011) evaluó el potencial de inhibición de la ECA-1 a partir de hidrolizados proteicos de amaranto. En este estudio se utilizaron las enzimas alcalasa, tripsina y quimiotripsina para obtener hidrolizados proteicos y posteriormente evaluar su capacidad de inhibición sobre la ECA-1 y su efecto en la disminución de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Para el análisis en roedores se administraron de forma intragástrica hidrolizados de amaranto a ratas SHR, la dosis óptima reportada fue de 2.4 g/kg de hidrolizado tras su hidrólisis con alcalasa. Esta concentración de hidrolizado causó una disminución significativa de la presión arterial 3 horas después de su administración y se mantuvo hasta las 7h posteriores a la administración del hidrolizado, el ensayo de inhibición de la ECA-1 posicionó a la enzima alcalasa como la generadora de péptidos con la mayor capacidad de inhibición sobre la ECA-1.

Adicionalmente Quiroga *et al.*, (2015) evidenciaron que no solo la inhibición de la ECA-1 propiciaba una disminución de la presión arterial, si no que la inhibición de otras enzimas implicadas en el sistema RAA podían generar tal efecto. Quiroga propuso que péptidos de amaranto inhibían la acción de la enzima renina mediante un impedimento físico, probablemente debido a un acoplamiento de péptidos en su sitio activo situación que podría propiciar disminución de la HTA. Barba de la Rosa *et al.* (2010) evidenció que hidrolizados de glutelinas de amaranto mantienen la capacidad de inducir la producción de óxido nítrico un potente vasodilatador que puede contribuir al control de la presión arterial. Lo mencionado anteriormente expone que péptidos provenientes del grano de amaranto mantienen la capacidad de inhibir enzimas dentro del sistema RAA.

Recientemente Ramírez *et al.*, (2017) establecieron condiciones óptimas para la generación de péptidos antihipertensivos tras una hidrólisis con alcalasa a partir de un hidrolizado proteico de amaranto. En dicho estudio se identificó que al

suplementar ratas espontáneamente hipertensas con el hidrolizado mencionado anteriormente la presión arterial disminuía significativamente después de 3 horas de su administración, sin embargo, su evaluación cuando estos están contenidos dentro de una matriz alimentaria no han sido realizada.

Incorporación de Péptidos Antihipertensivos a Matrices Alimentarias

Algunos péptidos con capacidad antihipertensiva ya han sido empleados en alimentos que han sido comercializados como alimentos funcionales que aportan un beneficio en el control de la presión arterial. En ese sentido los métodos y las condiciones de procesamiento son de vital importancia para el cuidado de las características organolépticas. Comúnmente este tipo de productos son ricos en péptidos de bajo peso molecular di- tri- y tetra-péptidos, los cuales están compuestos de aminoácidos hidrofóbicos que comúnmente generan un sabor amargo en la boca (Saha y Hayashi 2001). Lo mencionado anteriormente probablemente ha limitado el uso de hidrolizados proteicos con efecto antihipertensivo y su adición a matrices alimentarias.

Algunos de los productos comercializados como coadyuvantes en regulación de la presión arterial que contienen péptidos antihipertensivos en su mayoría son leches fermentadas producto de la hidrólisis de caseínas. Por ejemplo, Calpis/Ameal S® (fermented milk) fue un producto comercializado con altos contenidos de péptidos IPP y VPP derivados de la hidrólisis con *L. helveticus* y *S. cerevisiae*. De igual manera también se han comercializado bebidas de vegetales bajo el nombre de (AmealPeptide®) con altos contenidos de péptidos IPP y VPP, los cuales son generados por la hidrólisis con *A. orizae*. La misma compañía (AmealPeptide®) comercializó tabletas con caseínas hidrolizadas las cuales exhibían capacidad antihipertensiva. Otro de los productos comerciales con características similares es Evolus® (fermented milk) con un alto contenido en aminoácidos IPP y VPP

generados tras la hidrólisis con *L. helvicus*. Recientemente se ha comercializado un producto nutracéutico bajo el nombre de Peptide®Tension con alto contenido de aminoácidos IPP y VPP generados tras la hidrólisis de leche con *L. helveticus* presentado en forma de cápsulas. Algunos productos comercializados hasta la fecha de escritura de este manuscrito se muestran a mayor detalle en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales productos alimenticios comercializados que contienen péptidos antihipertensivos en su composición (actualizado y tomado de Maqueda *et al*, 2012).

Péptidos	Actividades observadas	Nombre del producto	Empresa productora	Forma de presentación del producto	Fuente de los péptidos	Bibliografía
IPP, VPP	Antihipertensivo	Peptide ®Tension	Peptide., Solutions. , Málaga España	Cápsulas	Leche	Ferreira-Santos <i>et al.</i> , 2016
RYLGY, AYFYPE L	Antihipertensivo	LowPep t®	Innaves., Vgo., España	Cápsulas	Leche	Recio <i>et al.</i> , 2011
Colágeno de pescado	Regulación de la presión arterial, Antihipercolesterolemia	BioZate 3 hidrolizado de proteína	Davisco foods, Minnesot a. MN, USA	Producto energético	Piel de pescado	Yamada <i>et al.</i> (2013)
IPP, VPP	Antihipertensivo	Ameal S 120	Calpis Co., Ltd., Tokyo Japon.	Bebida	Leche	Phelan <i>et al.</i> , (2012)
AKYSY	Antihipertensivo	Peptide Nori S	Riken Vietnam	Bebida	Algas rojas	Nori., (2012)
LVY	Antihipertensivo	Goma Pepucha	Suntory Beberage & food Ltd.,	Bebida	Sésamo	Nakano <i>et al.</i> ,(2006)

			Tokyo Japon			
IPP, VPP	Antihipertensivo	Evolus®	Valio., Helsinki, Finlandia	Bebida	Leche	Jauhainen <i>et al.</i> , (2005)
VP, IP, IVY	Antihipertensivo	StayBalance RJ.	Api Co., Ltd., Gifu-city, Japon	Bebida	Jalea real	Tokunaga <i>et al.</i> , (2004)
FY, VP, IY	Antihipertensivo	Wakame jelly	Riken vitamin, Tokyo Japon.	Gelatina	Algas	Sato <i>et al.</i> , (2002)
LKPNM	Antihipertensivo	Peptide tea™	Nippon supplement Inc., Osaka, Japon	Polvo	Pescado	Kawasaki, seki and Osajima., (2000)
LKPNM	Antihipertensivo	PeptACE™	Natural factors Nutritional Products Ltd., BC, Canada	Cápsulas	Pescado	Fujita and Yoshikawa., (1999).
FFVAPF PEVFGK	Antihipertensivo	Casein DP peptide drink	Kracie Pharmaceutical, Tokyo Japon.	Bebida	Leche	Sekiya <i>et al.</i> , (1992).

Actualmente, son muy pocos los registros de productos comercializados con un efecto sobre la presión arterial generados a partir de productos vegetales. Además, algunos de los productos ya comercializados han sido retirados del mercado. En este sentido es relevante la investigación acerca de la retirada de comercialización de productos con péptidos antihipertensivos en su composición, con el fin de identificar posibles problemáticas relacionadas con su aceptabilidad, falta de información de los beneficios de su efecto sobre la presión arterial.

En referencia a los hidrolizados proteicos que contienen péptidos antihipertensivos éstos han recibido especial atención. Su actividad ha sido probada *in vitro*, en modelos animales y en menor medida cuando se han adicionado a matrices alimentarias (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2011; Martinez-Maqueda *et al.*, 2012, Ramirez -Torres *et al.*, 2017). Lo mencionado anteriormente evidencia la necesidad de evaluaciones tecnológicas, sensoriales y del efecto que ejercen sobre la presión arterial hidrolizados proteicos que estén contenidos en matrices alimentarias. Todos estos avances se harán simultáneamente con los tecnólogos de alimentos ya que la formulación final del producto alimenticio es crucial para asegurar la actividad antihipertensiva tecnológica y sensorial.

Por todo lo anterior, este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto antihipertensivo de hidrolizados proteicos de amaranto con alcalasa añadidos a pastas de trigo con diferentes contenidos de proteína administrados en un modelo murino mediante el monitoreo de la presión arterial, además evaluar sus características sensoriales y tecnológicas.

HIPÓTESIS

Péptidos contenidos en HPA generados a partir de la hidrólisis de amaranto con alcalasa ejercerán un efecto antihipertensivo al ser añadidos a pastas de trigo, y este se prolongará al aumentar el contenido de proteína en las matrices alimentarias, conservando características sensoriales y tecnológicas aceptables.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto antihipertensivo de un hidrolizado proteico de amaranto obtenido con alcalasa añadido a pastas de trigo con diferentes contenidos de proteína y administradas en un modelo murino de hipertensión mediante el monitoreo de la presión arterial, así como evaluar sus características sensoriales y tecnológicas.

Objetivos Específicos

1. Obtener un hidrolizado proteico de amaranto rico en péptidos antihipertensivos a partir de un aislado proteico comercial de amaranto (COPRAM™) mediante una hidrólisis con alcalasa en condiciones optimizadas previamente por Ramírez *et al.*, 2017.
2. Diseñar y elaborar pastas a base de trigo con diferentes concentraciones de proteína y añadir el hidrolizado proteico de amaranto obtenidos en el objetivo anterior.
3. Evaluar características tecnológicas y sensoriales de las pastas generadas en el objetivo anterior.
4. Evaluar el efecto antihipertensivo a ratas espontáneamente hipertensas mediante el monitoreo de la presión arterial tras el consumo de pastas con hidrolizado proteico de amaranto en su composición

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de la biodisponibilidad de péptidos antihipertensivos de amaranto sobre la inhibición de la ECA-1, se centra en 4 etapas (figura 2):

- 1) Obtención del hidrolizado proteico de amaranto tras una hidrólisis con alcalasa bajo condiciones optimizadas y modificaciones menores según Ramirez-Torres., (2017).
- 2) Elaboración de pastas a base de trigo con diferente concentración de proteína, hidrolizado proteico de amaranto se añadirán como ingrediente adicional ala formulación.
- 3) Evaluaciones tecnológicas y sensoriales de las pastas producidas en este estudio.
- 4) Evaluación del efecto antihipertensivo tras el consumo de pastas de trigo con hidrolizado proteico de amaranto en su composición a ratas espontáneamente hipertensas mediante el monitoreo de la presión arterial.

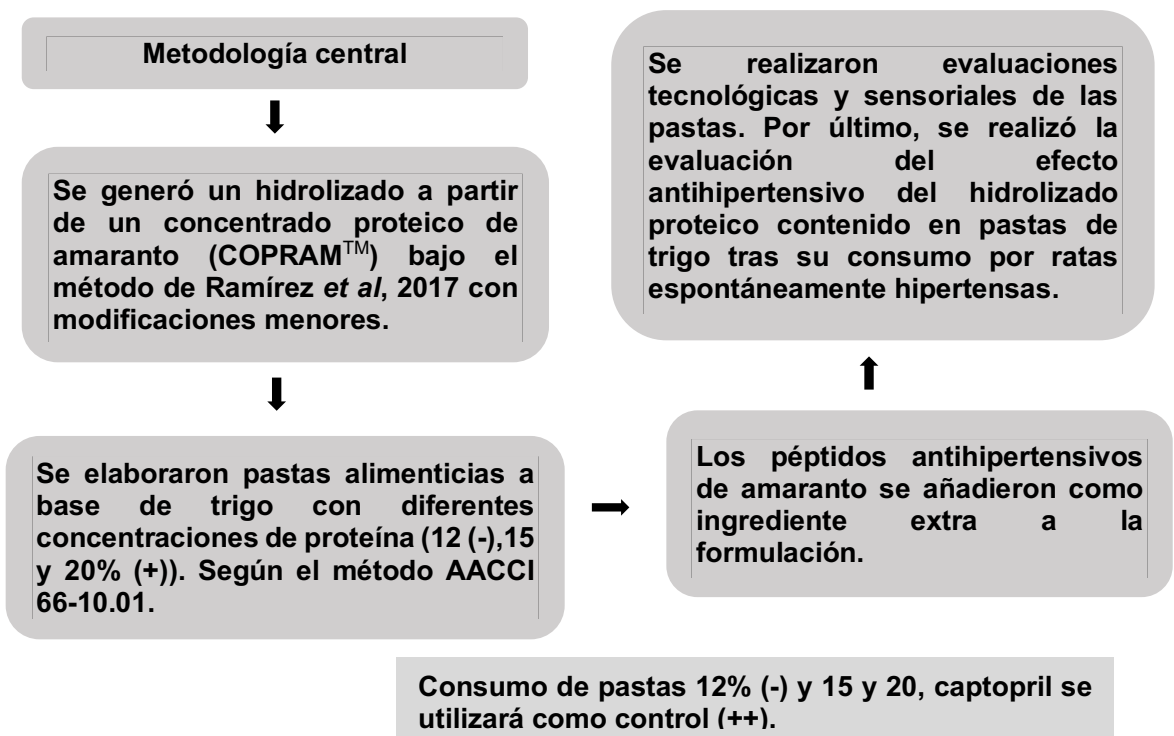


Figura 2. Esquema metodológico de la obtención y evaluación de biodisponibilidad de péptidos antihipertensivos de amaranto.

Muestras de Amaranto

La materia prima (amaranto) para la obtención del hidrolizado proteico fue gentilmente donada por San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R 297 de R.S. Comercialmente disponible bajo el nombre de COPRAM™ (Concentrado Proteico Amaranto). Sémola de trigo fue adquirida en Harinera de Sinaloa S.A de C.V

Cuantificación de Proteína de Materias Primas

La cuantificación de proteína del COPRAM™ y sémola de trigo se realizó haciendo uso del método oficial de la AOAC 960.52 (AOAC., 2000). El principio de este método se enfoca en determinar el contenido de proteína a partir del contenido de nitrógeno orgánico por el método de Kjeldahl. Los diversos compuestos nitrogenados se convierten en sulfato de amonio por ebullición con ácido sulfúrico concentrado. El sulfato de amonio formado se descompone con un álcali (NaOH) y el amoníaco liberado se absorbe en exceso de la solución estándar de ácido y luego se valora nuevamente con álcali estándar.

Obtención de Péptidos Antihipertensivos de Amaranto Mediante la Hidrólisis con Alcalasa

La obtención de péptidos antihipertensivos de amaranto se realizó siguiendo la metodología descrita por (Ramírez-Torres *et al.*, 2017) con modificaciones menores. El principio de este método consiste en realizar una incubación de COPRAM™ en condiciones optimizadas. El concentrado de amaranto se incubó en una relación 1/5 P/V en agua purificada dentro de una estufa de vapor (Thermo Scientific) bajo agitación continua durante 6.16 h a 52°C, además se añadió la enzima alcalasa

grado alimenticio a una concentración de 0.04mU/mg. La hidrólisis enzimática se detuvo calentando la solución a 85° durante 15 minutos.

Capacidad Inhibitoria Media sobre la ECA-1 (IC50)

La concentración media inhibitoria sobre la ECA-1 (IC50) del hidrolizado proteico de amaranto se evaluó utilizando un kit de inhibición ECA-1 (ACE kit-WST-Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones en serie del hidrolizado de amaranto para la construcción de la curva de inhibición de la ECA-1. El hidrolizado de amaranto se preparó y utilizó para construir una curva de inhibición de ECA-1. La concentración de proteína del hidrolizado de amaranto se determinó utilizando el kit BCA (kit BCA, Pierce™ Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.). La concentración de hidrolizado de amaranto requerida para producir el 50% de la inhibición de ECA-1 se consideró como el IC50 y se expresó como mg / ml.

Formulación de Pastas a Base de Trigo con Diferentes Concentraciones de Proteína

Las pastas elaboradas en este estudio con diferente concentración de proteína se elaboraron de acuerdo al método oficial de la AACCI 66-10.01 con modificaciones en sus pasos de secado (Islas *et al.*, 2014). Los ingredientes para la preparación de las pastas se enumeran en la tabla 2. Se elaboraron (tallarines) a partir de sémola de trigo. El ajuste en la concentración de proteína se llevó a cabo mediante sustituciones de sémola de trigo por concentrado proteico de amaranto COPRAM™. Cada formulación fue mezclada en una batidora (Kitchen Aid, St, Joseph, MI) de acuerdo con el tiempo de mezclado establecido en mixogramas (10 min), posteriormente, el hidrolizado proteico de amaranto se añadió gradualmente durante el mezclado hasta alcanzar una concentración final de 4% (p / p), y se dejó reposar durante 30 minutos en una cámara de fermentación (National Mfg. Co.,

Lincoln, NE) a 30 °C y 95% HR. Después la masa se laminó a temperatura ambiente utilizando una máquina para pasta (Columbian Home Products, Terre Haute, IN, Item # 330-54), utilizando el ajuste número 4. El proceso de secado de las pastas se llevó a cabo en 3 etapas, las primeras 2 en un horno (Micro-Pak Series MP500, Clackamas, OR) en condiciones 60° C y 65% HR durante 3 horas, 40 °C y 30% HR durante 5 horas respectivamente, por último, se aplicó un secado a 50 °C durante 3 horas con ausencia de humedad en un horno de secado (RedLine RF 115 UL, Binder, Tuttlingen, Alemania).

Tabla 2. Formulaciones usadas para la elaboración de pastas con modificaciones en su contenido de proteína elaboradas de acuerdo con el método 66-42.01 AACCI.

Ingredientes	12% proteína (pasta A)	15% proteína + HPA (pasta B)	20% proteína + HPA (pasta C)
Sémola de trigo	100%	91.47%	50%
Concentrado proteico de amaranto COPRAM™	0%	8.53%	43%
Hidrolizado proteico de amaranto	0	4g/100g de masa	4g/100g de masa

Adición de Hidrolizado Proteico de Amaranto a Pastas de Trigo

El hidrolizado proteico de amaranto (HPA) se añadió a la formulación de la pasta como un ingrediente adicional durante el mezclado. Se ha identificado que durante el mezclado se desarrollan la mayoría de las interacciones entre polímeros y proteínas presentes entre el grano de amaranto y trigo e.g (formación de redes poliméricas, interacciones entre los residuos de gluteínas y fracciones proteicas del amaranto, desarrollo de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Oszvald *et al.*, 2009; Tamas *et al.*, 2002; Ramírez-Torres *et al.*, 2017). La concentración de hidrolizado proteico de amaranto se ajustó para asegurar un consumo de 2.4 g/Kg de peso del roedor cuando estos consumen 8 g de pasta (máxima cantidad que consumen los animales del estudio en ayunas), de acuerdo con Ramírez *et al.*, 2017.

Evaluación de las Características Tecnológicas de las Pastas

Calidad de Cocción

La evaluación de las características tecnológicas de las de las pastas se realizó de acuerdo con los métodos oficiales de la AACCI método 66-10.01 (AACCI, 2000). Se evaluó el tiempo óptimo de cocción (TOC), la pérdida de sólidos y la capacidad de absorción de agua durante la cocción. 25 g de pasta seca se pusieron a cocer por triplicado en vasos de precipitado con 300 mL de agua en ebullición. Se tomó una muestra cada 30 segundos para evaluar el nivel de gelatinización del almidón mediante la observación a contra-luz de la muestra de pasta colocada entre dos portaobjetos; el tiempo al que se detectó una gelatinización completa fue considerado como el tiempo óptimo de cocción. La pérdida de sólidos se determinó pesando los sólidos dispersos en agua que persisten después de la evaporación en una estufa de vapor a 105 °C durante 24 h.

La capacidad de absorción de agua se determinó calculando la diferencia de peso entre la pasta seca y el peso al final de la pasta cocida en su tiempo óptimo de cocción.

Textura

Pastas cocidas (al tiempo óptimo de cocción) fueron sometidas a pruebas de textura. El grosor fue evaluado en un calibrador digital Powerfix. La fuerza de corte y adhesividad fueron tomados como puntos de referencia de calidad de las formulaciones secas y cocidas en un texturómetro TAX.TPPlus, calibrado para una celda de carga de 5kg a una velocidad de prueba 0,1 mm/s, distancia 1,6 mm, umbral de fuerza 0.01 N. Se utilizaron tiras de pasta de 3 cm y se emplearon 7 repeticiones por muestra.

La fuerza máxima obtenida de La curva de fuerza vs distancia descrita por el analizador de textura fue Registrado como medida de la firmeza de la pasta seca y cocida, el área negativa de la curva fue tomada como adhesividad y reportado como -N* Sec.

Color

El color de pastas secas y cocidas fue evaluado en un colorímetro digital Minolta (Japón) modelo (CR-400). Los resultados se expresaron en el espacio CIELAB como L * (luminosidad; 0 = negro, 100 = blanco), a * (+a = rojo, -a = verde) y b * (+b = amarillo, -b = azul).

Análisis Proximal

La composición proximal se evaluó de acuerdo con los métodos de la AOAC. Se evaluó la humedad, secando los productos a 105 ° C durante 24 h (método

925.09B); la cantidad de proteína cruda se calculó usando el ensayo micro-Kjeldahl (método 960.52); la determinación de lípidos se realizó desengrasando los productos en un aparato Soxhlet usando éter de petróleo como disolvente (método 920.39C); las cenizas fueron calculadas por incineración a 550 ° C (método 923.03); y los carbohidratos se calcularon por diferencia de los otros macronutrientes. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron en g / 100 g en base seca.

Análisis Sensorial

Las pruebas sensoriales a alimentos son de gran importancia ya que detallan parámetros de aceptabilidad o calidad entre los consumidores y toman mayor relevancia si estos pretenden ser comercializados (Wansink, 2003). En este sentido, se realizó un análisis sensorial de tipo descriptiva y una prueba triangular de tipo discriminatoria.

Treinta panelistas no entrenados participaron en el análisis sensorial. Los atributos sensoriales (color, olor, sabor, y textura) y la apreciación global de los productos fueron evaluados en una escala hedónica en donde (0 = totalmente no me gusta, 10 = me gusta mucho) y esto se realizó siguiendo el método establecido por la Organización Internacional de Normalización (ISO) -11136: 2014 [18]. Adicionalmente se realizó una prueba discriminatoria de tipo triangular basada en el método ISO-4120: 2004 para verificar la capacidad de los panelistas en la discriminación entre los tres tipos de pasta (A, B y C). En esta prueba se proporcionaron a cada panelista seis secuencias de muestras (1: A, A, B; 2: A, B, B; 3: A, A, C; 4: A, C, C; 5: B, B, C; y 6: B, C, C) para que los panelistas identificaran la muestra distinta y las semejantes. La diferencia perceptible entre los productos se evaluó utilizando tablas estandarizadas, de acuerdo con a ISO-4120: 2004.

Evaluación del Efecto Antihipertensivos de Hidrolizado Proteico de Amaranto con Alcalasa Adicionados a Pastas de Trigo y Suministrados a Ratas Espontáneamente Hipertensas

Grupos de seis ratas macho espontáneamente hipertensas (12 semanas de edad, 300–350 g de peso corporal) se mantuvieron con alimento y agua disponible en todo momento *at libitum* hasta antes de su evaluación, en donde se mantuvieron en ayuno 12 horas previas. La evaluación consistió en el consumo libremente de 8 g de pasta cocida A (control), B o C por parte de los roedores. Como control positivo, se incluyó un cuarto grupo de ratas que recibió captopril (25 mg / kg de peso corporal de la rata) de forma intragástrica utilizando sondas de plástico (18GA 75mm, Instech laboratories, Inc.). La presión arterial se evaluó antes de la suplementación y se denominó (tiempo cero) y después de la suplementación se evaluó (a intervalos de 1 h durante 9 h). Se utilizó un monitor de presión arterial CODA - tail cuff (Kent Scientific, Torrington, CT, EE. UU.). Cabe destacar que los ensayos en animales realizados en esta investigación fueron avalados y aprobados por la Junta de Revisión de Ética de la Universidad Autónoma de Sinaloa bajo el protocolo de estudio (CE UACNYG-2015-SEP-001).

Análisis Estadístico

Todos los datos obtenidos en este estudio se analizaron con el software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) a datos. Los datos distribuidos normalmente se expresaron como media y desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se analizaron usando ANOVA y Tukey. Los datos no distribuidos normalmente se expresaron como mediana y rango intercuartílico. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando las pruebas de Kruskal Wallis y prueba de Dunn. Un valor de $p > 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Cuantificación de Proteínas de Materias Primas

El porcentaje total de proteína obtenido mediante el método de Micro-Kjeldahl en COPRAM™ fue de 21.5 % resultando superior que en la sémola de trigo (11.58 %).

Obtención de Péptidos Antihipertensivos de Amaranto Mediante la Hidrólisis con Alcalasa

La obtención del hidrolizado proteico de amaranto a partir de COPRAM™ tras una hidrólisis con alcalasa grado alimenticio de acuerdo con Ramírez *et al*, 2017, se realizó con modificaciones menores y fueron excluidos todas aquellas sustancias que no fueran grado alimenticio. Un total de 800 g de hidrolizado proteico de amaranto fue obtenido con la metodología descrita anteriormente.

Capacidad inhibitoria media sobre la ECA-1 (IC50)

La hidrólisis de la proteína de amaranto con alcalasa de grado alimenticio genera un hidrolizado con ECA-1 con actividad inhibitoria. El valor de IC50 del hidrolizado fue de 0.014 mg / mL y el 100% de inhibición de la ECA-1 se observó a los 0.88 mg / mL como se ilustra en la figura 3. El resultado de inhibición de nuestro estudio fue mayor que el valor IC50 obtenido por captopril (0.043 mg/ml) calculado por el fabricante del kit y fue casi 10 veces menor que los valores IC50 reportados por otros autores que utilizaron la misma fuente de proteína y enzima (Fritz *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2017). Este resultado se puede atribuir a las diferencias en las

condiciones de hidrólisis en este estudio ya que el grado de hidrólisis de proteína de amaranto en las condiciones utilizadas alcanzaron valores del 75% (Ramírez *et al*, 2017), mientras que otros informan grados de hidrólisis del 45 y 65% respectivamente. Lo mencionado anteriormente es relevante ya que los di-, tri- y tetra-péptidos son los mejores inhibidores de la ECA-1 y estos se generan después de una proteólisis exhaustiva.

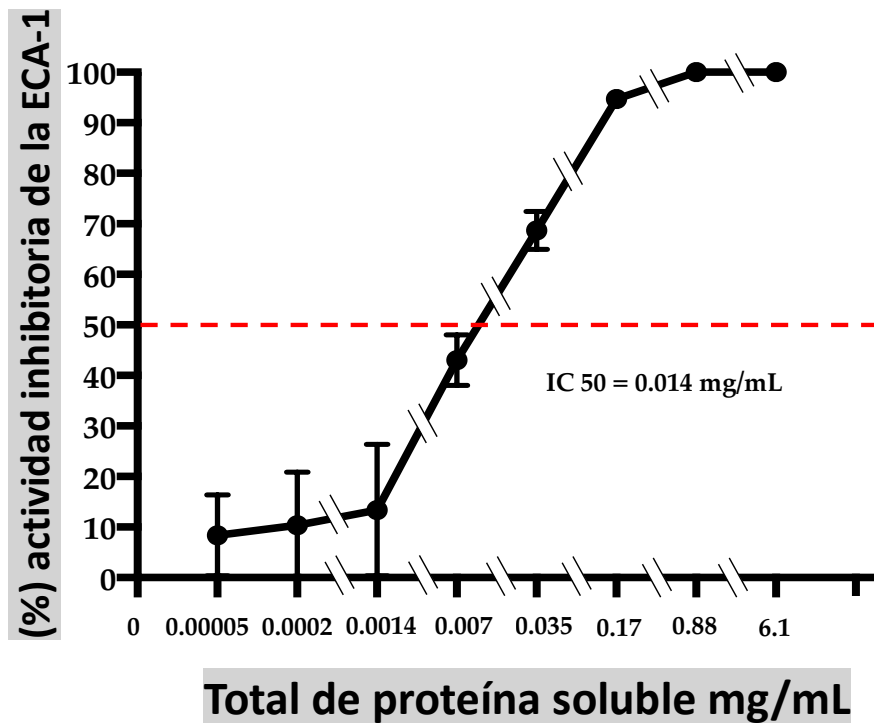


Figura 3. Determinación del grado de inhibición por triplicado de la ECA-1, en condiciones optimizadas de hidrolizado: pH 7.01; temperatura 52 ° C; concentración de enzima 0,04 mU / mg de proteína; tiempo de reacción 6,16 h). ACE-1: enzima convertidora de angiotensina-1 utilizando el kit WST-Dojindo Molecular Technologies.

Evaluación de las Características Tecnológicas de las Pastas

Calidad de Cocción

La medición de calidad consistió en determinar los parámetros: tiempo óptimo de cocción, pérdida de sólidos durante ésta, así como el aumento de peso después de la cocción. Estos resultados se muestran en la Tabla 3. El tiempo óptimo de cocción y la pérdida de sólidos disminuyeron en las pastas con el mayor contenido de proteína (Pasta B y C). Lo anterior puede asociarse con la reducción del contenido de almidón y aumento de proteína debido a la adición del hidrolizado proteico de amaranto lo que puede generar una menor gelatinización de almidón (Fuad *et al*, 2010) además el incremento de la concentración de proteína puede generar reordenamientos moleculares dentro de la microestructura de la pasta (Fradique *et al*, 2013). Algunos de los reordenamientos que ocurren entre los componentes del trigo y el hidrolizado proteico de amaranto incluyen la formación de redes poliméricas, interacción entre residuos de glutelinas y fracciones proteicas de amaranto, desarrollo de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas entre otras (Oszvald *et al*, 2009, Ramírez-Torres *et al*, 2017). Las ganancias de peso no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Características de calidad de cocción de la pasta de sémola con diferentes concentraciones de proteínas y péptidos antihipertensivos en su formulación.

Muestra	TOC^b	Pérdida de sólidos (g/100 g)	Ganancia de peso (g/100 g)
Pasta A	10.5 ^b ± 0.05	11.5 ^b ± 0.45	207 ^a ± 4.9
Pasta B	7.5 ^a ± 0.05	8.9 ^b ± 0.11	205 ^a ± 6.0
Pasta C	5.5 ^a ± 0.01	7.3 ^a ± 1.06	193 ^a ± 1.0

Diferentes letras entre columnas significan diferencia estadística ($p < 0.05$) evaluada con una prueba Tukey's. ^b TOC: Tiempo Optimo de Cocción. El símbolo ± corresponde a desviación estándar.

Textura

La textura se evaluó después de cocer la pasta en el tiempo óptimo. La firmeza de aumentó en la pasta con mayor contenido de proteína ($p < 0.05$). Comúnmente la adición de material proteico distinto al gluten conduce a una disminución de la firmeza ya que la red de gluten puede perder fuerza y afectar la estructura de la pasta (Rayas-Duarte, 1996), sin embargo, en nuestro estudio la firmeza se incrementó, esto puede ser atribuido a la naturaleza de la proteína añadida y al tratamiento térmico durante los pasos de secado. Por el contrario, la adhesividad disminuyó en las pastas con mayor contenido de proteína; esto es se debe a que sustituciones de sémola de trigo por otros ingredientes provoca una menor capacidad de hidratación por parte de la masa (Osvald *et al*, 2009).

Tabla 4. Características de textura de pastas de trigo y pastas de trigo con semolina y amaranto

Muestra	Tipo de presentación	Grosor (mm)	Firmeza (N)	Adesividad (-N*Sec)
Pasta A	Cocida	2.85 ^c	3.31 ^a ± 0.26	0.053 ^a ± 0.011
Pasta B	Cocida	2.74 ^b	3.64 ^b ± 0.77	0.043 ^b ± 0.010
Pasta C	Cocida	2.60 ^a	5.73 ^c ± 0.75	0.041 ^c ± 0.007

Diferentes letras entre columnas significan diferencia estadística ($p < 0.05$) evaluada con una prueba Tukey's. Los valores \pm corresponden a la desviación estándar.

Color

Las evaluaciones de color de cada una de las pastas tanto secas como cocidas se muestran en la tabla 5. Las pastas cocidas B y C mostraron valores de L^* más bajos que la pasta control ($p > 0.05$), esto puede asociarse al desarrollo de color marrón en las pastas con alto contenido de proteína y aumento de reacciones de Maillard (Nicoli *et al*, 1999) las cuales requieren de azúcares reductores y grupos aminos libres que se podrían incrementar en pastas suplementadas con hidrolizados de proteína. Por otro lado, los parámetros a^* y b^* variaron entre pastas secas y cocidas ($p > 0.05$), el desarrollo de color marrón fue más evidente en pastas b y c antes o después de su cocción (Anexo 1).

Tabla 5. Parámetros de color obtenidos de pastas secas y cocidas.

Muestra	Tipo de presentación	<i>L</i>*	<i>a</i>*	<i>b</i>*
Pasta A	Seca	78.5 ^d	2.02 ^a	17.4 ^b
	Cocida	78.5 ^d	1.01 ^a	16.7 ^a
Pasta B	Seca	72.1 ^c	4.3 ^b	21.6 ^c
	Cocida	56.2 ^a	7.8 ^c	24.5 ^{de}
Pasta C	Seca	60 ^b	7.6 ^c	24.1 ^d
	Cocida	55.7 ^a	8.2 ^{cd}	25.1 ^f

Diferentes letras entre columnas significan diferencia estadística ($p < 0.05$) evaluada con una prueba Tukey's. ^b Tiempo de cocción óptimo.

Análisis Proximal

Los resultados del análisis de composición nutrimental se muestran en la Tabla 6. El contenido de proteína fue superior en las pastas que contienen amaranto en su formulación pasando de 10.26 g/100 g de pasta (A) a 13.88 y 17.93 g/100 g de pastas B y C respectivamente. El contenido de proteína en pastas cocidas fue menor, situación que manifiesta que algunas proteínas salen de la matriz alimentaria durante la cocción, pasta (A) cocida 9.31 g/100 g y 10.52 y 17.70 g/100 g para pastas (B y C).

El contenido de grasa fue mayor en las pastas B y C (1.33 y 2.05 g/100 respectivamente) que en la pasta A (0.85 g/100 g), esto se puede asociar a un alto contenido de ácidos grasos en el grano de amaranto (Bressani, 2012). Cuando las pastas fueron cocidas estos valores de grasa disminuyeron lo que se puede asociar a una pérdida de este componente durante la cocción. El contenido de cenizas aumentó cuanto más alta era la concentración de amaranto en su composición. El contenido de cenizas fue mayor en las pastas que contenían más amaranto en su composición (B y C). El contenido de carbohidratos fue disminuyendo a medida que decrecía el contenido de harina de trigo en las pastas (tabla 6).

Tabla 6. Análisis de composición química de pastas de trigo y pastas de **trigo y** pastas de trigo con semolina y amaranto.

Muestra (SM: COPRAM™)	Humedad (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Grasa (g/100 g)	Ceniza (g/100 g)	Carbohidratos^b (g/100 g)
Cocida					
Pasta A (100:0)	58.33 ± 0.11 ^d	9.31 ± 0.16 ^a	0.74 ± 0.12 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	89.72 ^{ef}
Pasta B (85:15) + HPA	54.53 ± 0.16 ^c	10.52 ± 0.50 ^c	0.98 ± 0.55 ^a	0.56 ± 0.08 ^b	87.94 ^e
Pasta C (50:50) + HPA	50.88 ± 0.11 ^b	17.70 ± 0.05 ^e	1.07 ^b	1.22 ± 0.05 ^e	80.01 ^c
Seca					
Pasta A (100:0)	7.64 ± 0.01 ^a	11.10 ± 0.01 ^b	0.92 ± 0.61 ^a	0.63 ± 0.01 ^d	87.33 ^{cd}
Pasta B (85:15) + HPA	7.84 ± 0.01 ^a	15.06 ± 0.29 ^d	1.44 ± 0.34 ^c	0.90 ± 0.01 ^d	82.59 ^b
Pasta C (50:50) + HPA	8.12 ± 0.01 ^a	19.90 ± 0.06 ^f	2.27 ± 0.40 ^{cd}	0.92 ± 0.01 ^d	76.89 ^a

^b carbohidratos calculados por diferencia.

Análisis Sensorial

Se obtuvieron los resultados de la evaluación de las pastas por parte de 30 panelistas no entrenados. La edad promedio fue de 25.7 años con una distribución de 18 mujeres y 12 hombres. La figura 4 muestra los resultados obtenidos del análisis descriptivo. La pasta A obtuvo la mejor apreciación global y se observaron diferencias significativas en comparación con las pastas B y C ($P > 0,05$), respecto a los otros atributos sensoriales (color, olor, sabor y textura) no se apreciaron diferencias significativas entre los 3 tipos de pasta. Estos resultados son relevantes ya que regularmente sustituciones por arriba del 10% de los ingredientes tradicionales de la pasta modifica sus atributos sensoriales (Mercier *et al*, 2016).

Los resultados de la prueba discriminativa se muestran en la figura 5. Los panelistas pudieron distinguir en cada una de las secuencias entre los diferentes tipos de pasta, es decir todas las secuencias eran distinguibles entre si a un nivel de confianza de $p \geq 0.05$. Cabe destacar que algunos panelistas expusieron que tras el consumo de las pastas b y c apreciaban un sabor amargo en la boca, esto ya ha sido reportado como una característica de algunos péptidos antihipertensivos (Zhou *et al*, 2013; Hernandez-Ledesma *et al*, 2011), de tal forma que mas evaluaciones de este tipo son necesarias.

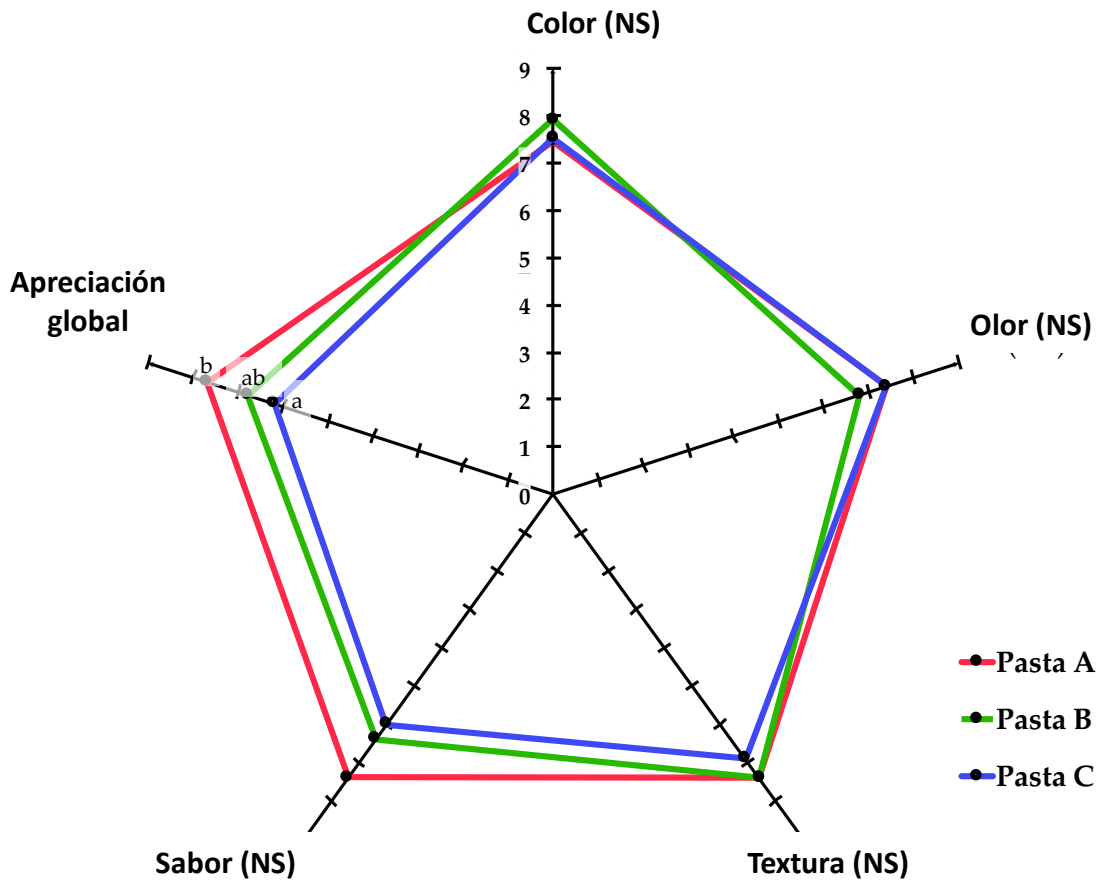


Figura 4. Atributos sensoriales descriptivos para pastas control (A), Pasta amaranto 15% proteína (B), Pasta amaranto 18% proteína (C). Los números dentro del gráfico radial hacen referencia a una escala hedónica.

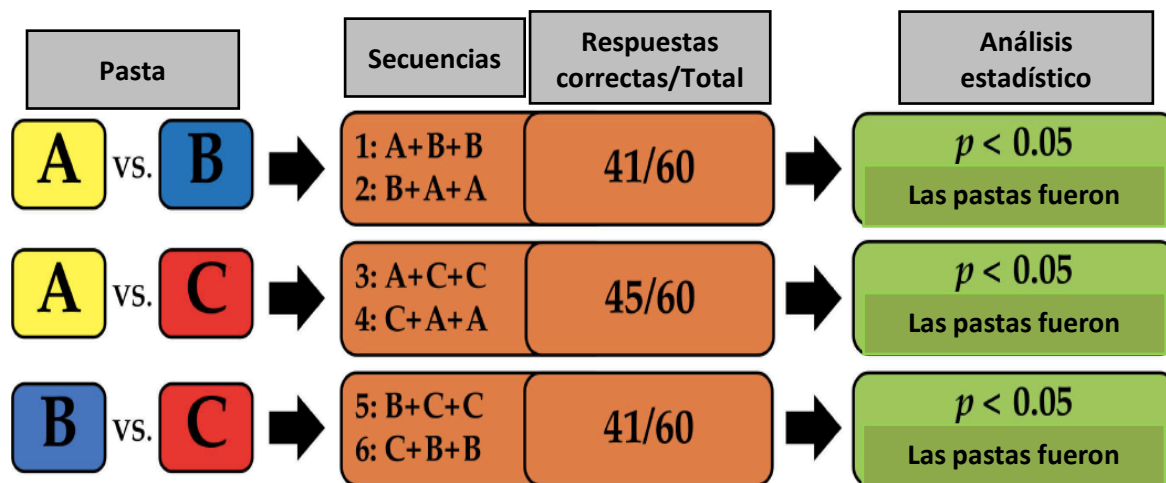


Figura 5. Prueba triangular de tipo discriminatoria para cada una de las secuencias asignadas a los panelistas. Las diferencias estadísticas fueron estimadas de acuerdo a la ISO-4120:2004.

Evaluación del Efecto Antihipertensivo en Ratas Espontáneamente Hipertensas

La evaluación del efecto antihipertensivo del hidrolizado proteico de amaranto añadido a pastas de trigo tras ser consumidos por ratas espontáneamente hipertensas se ilustra en la figura 6. La presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas fue de 199.33 ± 20.90 mmHg. En comparación con la pasta de control, la presión arterial se redujo significativamente ($p < 0.05$) después de las 3 h de la ingestión de pasta B o C (ambas contenían el hidrolizado de amaranto). El grupo control positivo en el que se suministró el fármaco captopril mostró efecto antihipertensivo más potente que los tres tipos de pasta probados ($p < 0.05$). En comparación con la pasta de control, la reducción de la presión arterial se mantuvo durante 7 h en los grupos suplementado con pasta B y 8 h en aquellos suplementados con pasta C ($p < 0.05$). Por otro lado, el grupo evaluado con captopril mantuvo su efecto antihipertensivo hasta la última evaluación de la presión arterial, 9 h después de la administración de captopril.

Los niveles de presión arterial mantuvieron un descenso mayor en la pasta C (mayor contenido de proteína), las proteínas pueden inducir reordenamientos moleculares en la matriz alimentaria que aumenten la firmeza y en consecuencia pueden contribuir a atrapar péptidos antihipertensivos más eficientemente y liberarlos en el tracto digestivo, en este sentido Ten Have *et al*, 2015 afirmó que matrices alimentarias ricas en proteína puede retrasar la liberación y absorción de péptidos antihipertensivos pudiendo conducir a un incremento de su biodisponibilidad.

Con los hallazgos del presente estudio podemos concluir que la suplementación de hidrolizado proteico de amaranto con alcalasa a pastas de trigo reduce significativamente la presión arterial en ratas hipertensas tras las primeras horas después de su consumo y hasta 8 h posteriores.

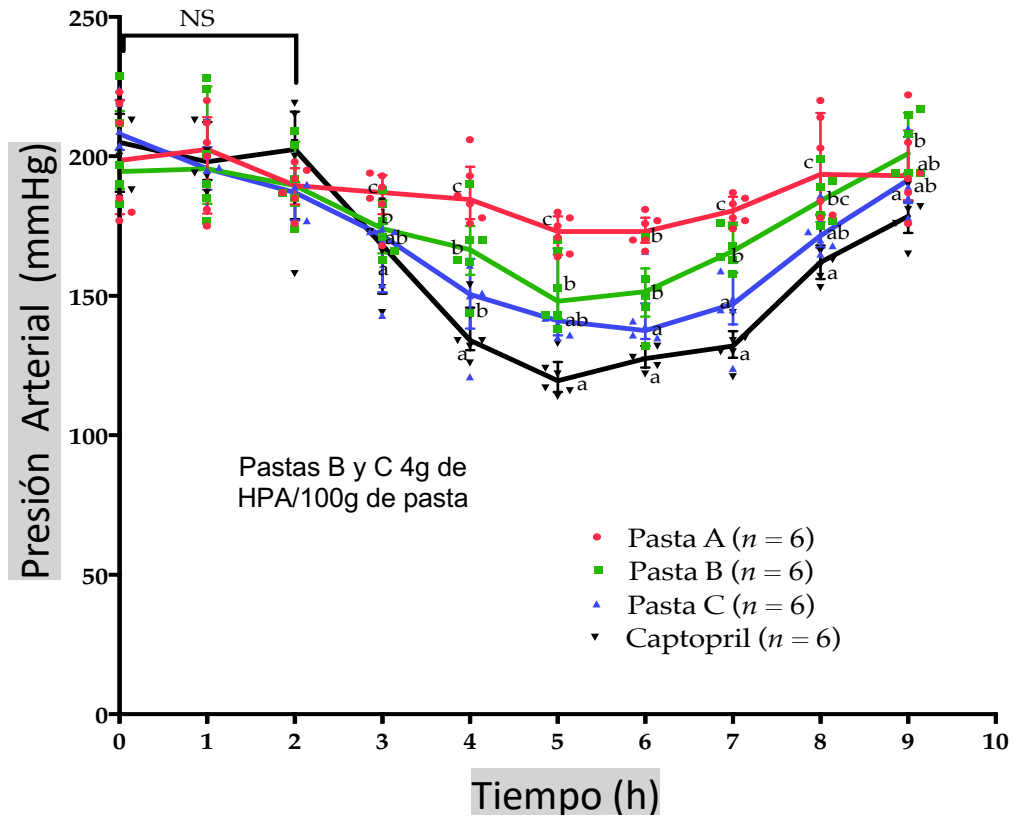


Figura 6. Presión arterial sistólica en ratas espontáneamente hipertensas después de la suplementación con tres tipos de pasta y captopril. Las comparaciones en cada momento se llevaron a cabo utilizando parámetros no paramétricos. Prueba ANOVA y Kruskal-Wallis. HPA: Hidrolizado Proteico de Amaranto. Letras diferentes en puntos de tiempo específicos significan diferencias significativas ($p < 0,05$). NS: diferencia no significativa.

CONCLUSIONES

Los hidrolizados proteicos de amaranto obtenidos con alcalasa mantienen propiedades antihipertensivas y este efecto se mantiene después de su adición en pastas de trigo. En el mismo sentido los hidrolizados proteicos de amaranto mantienen su biodisponibilidad y su efecto antihipertensivo después de 3 h y hasta 8 h después de que ratas espontáneamente hipertensas son suplementadas con pastas de trigo donde estos son contenidos. El efecto antihipertensivo se prolongó en las pastas con mayor contenido de proteína. Los atributos sensoriales de pastas de trigo que contienen hidrolizados proteicos de amaranto en su composición no son afectados considerablemente, aunque se debe mejorar la aceptación final por parte de los consumidores. Con lo mencionado anteriormente podemos concluir que se probó la hipótesis planteada en este estudio y podría justificar estudios adicionales para evaluar su seguridad y uso como ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 66-42.01. Small scale pasta processing. Approved (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 46-12.01. Total protein of the Kjeldahl method modification of Boric Acid. Approved (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 66-50.01. Quality and Cooking Pasta and Noodles. Approved (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 79-09.01. Measurement of bread signature. Approved (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 44-15.01. Measurement of humidity in the air stove. Approved (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 74-09.01. Measurement of Bread Firmness by Universal Testing Machine (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 08-01.01. Basic method of evaluation of ash. Approved (10) (03), (1999). AACC International, St. Paul, MN, USA UU.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis (18th ed.). Washington, DC: Association of official Analytical Chemists.
- Abboud, C. S., Wey, S. B. and Baltar, V. T. (2004). Risk factors for mediastinitis after cardiac surgery. *Annals of Thoracic Surgery*, 77(2), 676-683.
- Aggett, P. J. (2010). Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1433S-1437S.
- Agriculture Organization of the United Nations. Fishery Information, Data, & Statistics Service. (2004). *FAO Annuaire: Statistiques des pêches* (Vol. 98, No. 1). FAO.

- Aluko, R. E., (2015). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *In: Doyle, M. P. and Klaenhammer, T. R. eds. Annual Review of Food Science and Technology, Vol 6. Palo Alto: Annual Reviews, 235-262.*
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry, 99(1), 191-203.*
- Barquera, S., *et al.* Campos-Nonato, I., Hernandez- Barrera, L., Villalpando, S., Rodriguez-Gilabrt, C., Durazo-Arvizu, R., & Aguilar- Salinas C. A. (2010). Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica De Mexico, 52, S63-S71.*
- Bressani, R. (2012). El amaranto y su potencial en la industria alimentaria. *Alimentos Hoy, 7(7), 15-19.*
- Cian, RE, Garzón, AG, Ancona, DB, Guerrero, LC y Drago, SR (2015). Los hidrolizados de algas *Pyropia columbina* tienen agregación antiplaquetaria, antioxidante y péptidos inhibidores de la ECA I que mantienen la bioactividad después de la digestión gastrointestinal simulada. *LWT-Food Science and Technology , 64 (2), 881-888.*
- Cicero, A. F. G. & Borghi, C. (2013). Evidence of Clinically Relevant Efficacy for Dietary Supplements and Nutraceuticals. *Current Hypertension Reports, 15(3), 260-267.*
- Faradonbeh, N. A., Nikaeen, F., Akbari, M., Almasi, N., & Vakhshoori, M. (2018). Cardiovascular disease risk prediction among Iranian patients with diabetes mellitus in Isfahan Province, Iran, in 2014, by using Framingham risk score, atherosclerotic cardiovascular disease risk score, and high-sensitive C-reactive protein. *ARYA atherosclerosis, 14(4), 163.*
- Ferrario, C. M. and Mullick, A. E. (2017). Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacological Research, 125, 57-71.*
- Fradique, M., *et al.* 2010. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(10), 1656-1664.*
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry, 126(3), 878-884.*
- Fujita, H., Yamagami, T. and Ohshima, K. (2001). Effects of an ace-inhibitory agent, Katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in

- borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition Research*, 21(8), 1149-1158.
- Freeman, H. J. (2015). Clinical relevance of intestinal peptide uptake. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 6(2), 22.
- Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 4166-4174.
- Gleeson, J. P., Brayden, D. J. and Ryan, S. M. (2017). Evaluation of PepT1 transport of food-derived antihypertensive peptides, Ile-Pro-Pro and Leu-Lys-Pro using in vitro, ex vivo and in vivo transport models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115, 276-284.
- ISO, P. (2010). 11085: 2010. *Cereals, cereals-based products and animal feeding stuffs—Determination of crude fat and total fat content by the Randall extraction method*. Polski Komitet Normalizacyjny: Warsaw, Poland.
- Hernandez-Ledesma, B., Contreras, M. D. and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23-35.
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., & Pietrzak, M. (2013). The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food chemistry*, 141(4), 3774-3780.
- Kurosawa, M. T., Nakamura, Y., Yamamoto, N., Yamada, K., & Iketani, T. (2011). Effects of Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro on nondipper patients: a preliminary study. *Journal of medicinal food*, 14(5), 538-542.
- L'Vov, V. M. and Sadykov, E. S. (1999). Competitive inhibitors of the angiotensin-converting enzyme from the venom of the viper *Echis multisquamatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(3), 332-335.
- Li, P., *et al.* 2014. In vitro and in vivo ACE inhibitory of pistachio hydrolysates and in silico mechanism of identified peptide binding with ACE. *Process Biochemistry*, 49(5), 898-904.
- Mandalari, G., Rigby, N. M., Bisignano, C., Curto, R. B. L., Mulholland, F., Su, M., ... & Roux, K. H. (2014). Effect of food matrix and processing on release of almond protein during simulated digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 439-447.

- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, 3(4), 350-361.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J. and Michalska, J. (2011). Bovine Meat Proteins as Potential Precursors of Biologically Active Peptides - a Computational Study based on the BIOPEP Database. *Food Science and Technology International*, 17(1), 39-45.
- Murray, J. C., Kiszonas, A. M. and Morris, C. F. 2017. Pasta Production: Complexity in Defining Processing Conditions for Reference Trials and Quality Assessment Methods. *Cereal Chemistry*, 94(5), 791-797.
- Natesh, R., Schwager, S. L., Evans, H. R., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2004). Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, 43(27), 8718-8724.
- Oszvald, M., Tamás, C., Rakszegi, M., Tömösközi, S., Békés, F., & Tamás, L. (2009). Effects of incorporated amaranth albumins on the functional properties of wheat dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 882-889.
- Parada, J. and Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21-R32.
- Pauletti, G. M., Okumu, F. W. and Borchardt, R. T. (1997). Effect of size and charge on the passive diffusion of peptides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Pharmaceutical Research*, 14(2), 164-168.
- Poma, J., Carrillo, L. and González, J. (2018). Family Functionality and Modifiable Risk Factors for Arterial Hypertension. *Funcionalidad familiar y factores de riesgo modificables para hipertensión arterial.*, 59(1), 5-15.
- Puchalska, P., Alegre, M. L. M. and Lopez, M. C. G. (2015). Isolation and Characterization of Peptides with Antihypertensive Activity in Foodstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 521-551.
- 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.
- Ramírez-Torres, G., Ontiveros, N., Lopez-Teros, V., Ibarra-Diarte, J., Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E., & Cabrera-Chávez, F. (2017). Amaranth

- protein hydrolysates efficiently reduce systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Molecules*, 22(11), 1905.
- Islas-Rubio, A. R., de la Barca, A. M. C., Cabrera-Chávez, F., Cota-Gastélum, A. G., & Beta, T. (2014). Effect of semolina replacement with a raw: popped amaranth flour blend on cooking quality and texture of pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 217-222.
- Rutella, G. S., Solieri, L., Martini, S., & Tagliazucchi, D. (2016). Release of the antihypertensive tripeptides valine-proline-proline and isoleucine-proline-proline from bovine milk caseins during in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(45), 8509-8515.
- Rydberg, D. M., Mejyr, S., Loikas, D., Schenck-Gustafsson, K., von Euler, M., & Malmström, R. E. (2018). Sex differences in spontaneous reports on adverse drug events for common antihypertensive drugs. *European journal of clinical pharmacology*, 74(9), 1165-1173.
- Saha, B. C. and Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19(5), 355-370.
- Sutton, M., Kreider, K., Thompson, J., Germanwala, S., & Greifenkamp, J. (2018). Improving outcomes in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Nursing*, 36(4), 166-172.
- Taddei, S. (2015). Combination Therapy in Hypertension: What Are the Best Options According to Clinical Pharmacology Principles and Controlled Clinical Trial Evidence?. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 15(3), 185-194.
- Tamás, L., Gras, P. W., Solomon, R. G., Morell, M. K., Appels, R., & Bekes, F. (2002). Chain extension and termination as a function of cysteine content and the length of the central repetitive domain in storage proteins. *Journal of cereal science*, 36(3), 313-325.
- Ten Have, G. A., van der Pijl, P. C., Kies, A. K., & Deutz, N. E. (2015). Enhanced lacto-tri-peptide bio-availability by co-ingestion of macronutrients. *PloS one*, 10(6), e0130638.
- Torruco-Uco, J. G., Dominguez-Magana, M. A., Davila-Ortiz, G., Martinez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 6(2), 158-168.
- Tovar-Pérez, E. G., 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.

- Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24.
- Vecchi, B., & Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70(7), 864-870.
- Velarde-Salcedo, A. J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G. M., Díaz-Gois, A., de Mejia, E. G., & De La Rosa, A. P. B. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food chemistry*, 136(2), 758-764.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357-366.
- Wada, Y. and Lonnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(5), 503-514.
- Wansink, B. (2003). Response to "Measuring consumer response to food products". Sensory tests that predict consumer acceptance. *Food Quality and Preference*, 14(1), 23-26.
- Wu, J., Liao, W. and Udenigwe, C. C. (2017). Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 214-219.
- Zhou, P., Yang, C., Ren, Y., Wang, C., & Tian, F. (2013). What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food chemistry*, 141(3), 2967-2973.

PRODUCTIVIDAD

Publicación de un artículo de datos originales en la revista “Foods” (factor de impacto 3.011) en el artículo Valdez-Meza et al., 2019 Pasta Enrichment with an Amaranth Hydrolysate Affects the Overall Acceptability while Maintaining Antihypertensive Properties. Foods 8 (8), 282. Se anexa al presente documento. Durante la obtención de los resultados se realizó una estancia académica en el Instituto Superior de Agronomía en Lisboa Portugal, durante el periodo de septiembre a noviembre de 2018.



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

To whom is concerned

Eduardo Enrique Valdez Meza spent a research stay at LEAF - Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food Presentation, research unit from Instituto Superior de Agronomia – University of Lisbon, Portugal.

The stay started in September 2018 and finish at October 2018 (two months) and was developed under my scientific supervision.







The worked developed was focussed in the sensory and nutritional evaluation of enriched pasta with amaranth anti-hypertensive peptides.

The experimental work was developed according with the standard methodologies used in our research group and it is important to highlight the relevant capacity of Eduardo to acquires the respective skills and to obtain valuable results. These results were organised and statistically treated and a scientific paper is being prepared with the main results.

Eduardo's ability to integrate into our team was also very relevant, evidencing excellent human qualities. We recognize in this way the excellent contribution given to our team.

Article

Pasta Enrichment with an Amaranth Hydrolysate Affects the Overall Acceptability while Maintaining Antihypertensive Properties

Eduardo Enrique Valdez-Meza¹, Anabela Raymundo² , Oscar Gerardo Figueroa-Salcido³ , Giovanni Isai Ramírez-Torres⁴, Patrícia Fradinho² , Sonia Oliveira², Isabel de Sousa² , Miroslava Suárez-Jiménez¹, Feliznando Isidro Cárdenas-Torres³ , Alma Rosa Islas-Rubio⁵, Guillermo Rodríguez-Olibarría¹, Noé Ontiveros^{6,*} and Francisco Cabrera-Chávez^{3,*} 

¹ Department of Research and Food Science, University of Sonora, Hermosillo, Sonora 1658, Mexico

² LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

³ Nutrition Sciences Academic Unit, University of Sinaloa, Culiacán, Sinaloa 80019, Mexico

⁴ Department of Chemical and Biological Sciences, University of Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

⁵ Research Center for Food and Development, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

⁶ Division of Sciences and Engineering, Department of Chemical, Biological and Agricultural Sciences, University of Sonora, Navojoa, Sonora 85880, Mexico

* Correspondence: noe.ontiveros@unison.mx (N.O.); fcabrera@uas.edu.mx (F.C.-C.);

Tel.: +52-642-425-9950 (N.O.); +52-667-753-5454 (F.C.-C.)

Received: 28 June 2019; Accepted: 22 July 2019; Published: 24 July 2019



Abstract: Background: Alcalase-treated amaranth proteins generate angiotensin-1-converting enzyme (ACE-1) inhibitory peptides, which could be useful for functional foods development. Our aim was to evaluate the technological, sensory, and antihypertensive properties of pasta enriched with an amaranth hydrolysate. Methods: Pasta with 11% (A; control), 15% (B), and 20% (C) of protein content were formulated. Pastas B and C were supplemented with an alcalase-treated amaranth protein concentrate. Cooking time, cooking lost, color, and texture were assessed. An untrained panel ($n = 30$) evaluated sensory attributes. The antihypertensive effect was evaluated in hypertensive rats. Results: The hydrolysate IC₅₀ was 0.014 mg/mL. Optimum cooking time and cooking loss decreased in products B and C vs. A ($p < 0.05$). The L* values decreased in pasta C. Firmness increased in pasta C vs. A ($p < 0.05$). Adhesiveness was different among groups ($p < 0.05$). Pasta A had the highest acceptability ($p < 0.05$). The products B and C, and captopril (positive control) showed antihypertensive properties after 3 h of supplementation ($p < 0.05$). This effect remained after 7 h, 8 h, or 9 h. Conclusions: The addition of amaranth hydrolysates to pasta negatively impacts on the overall acceptability and, to a lesser extent, on pasta taste. However, it is possible to maintain the antihypertensive properties of the supplemented pasta under physiological conditions.

Keywords: amaranth protein; pasta; sensory evaluation; hypertension; functional food

1. Introduction

Functional foods provide health-related benefits beyond basic nutrition by virtue of the presence of physiologically active components [1,2]. These foods could contribute as an adjunct for the control of several diseases, such as high blood pressure. Potential ingredients for this purpose include anthocyanins [3], isoflavones [4], and peptides [5]. The mechanism for reducing blood pressure involves several pathways. Pharmaceutical drugs such as enalapril and captopril are inhibitors of angiotensin-1-converting enzyme (ACE-1), which is involved in the pathogenesis of hypertension. This

ACE-1 inhibitory activity is also exhibited by peptides from several dietary sources [6–8]. Particularly, di- and tri-peptides are absorbed more rapidly than free amino acids, mainly through the paracellular and transcellular routes or by specific transporter systems, such as the peptide transporter PepT1 [9,10]. Recent works have proven that the hydrolysis of amaranth proteins with microbial alcalase can release ACE-1 inhibitory peptides [11], and it has been proposed that both the bioavailability and the antihypertensive properties of the bioactive peptides are influenced by the food matrix characteristics [9]. For instance, the bioavailability of antihypertensive peptides can be improved by increasing the protein content of the food matrix, mainly due to delay on the gastric emptying [12].

The technological properties of food matrices, as well as their sensory characteristics, could be modified after the incorporation of new ingredients into standardized formulations. In fact, the incorporation of microalgae biomass [13] or amaranth proteins [14] in food pasta formulations modifies the technological and sensory profile of cooked pasta. This highlights that the addition of bioactive compounds to standardized pasta formulations deserves the evaluation of the technological and sensory properties of the new supplemented food product. Furthermore, the health benefits claimed should be evaluated *in vivo* to support, at least in part, the functionality of the functional foods proposed. Thus, the aim of the present study was to assess the technological and sensory characteristics of pasta, formulated with different protein content and supplemented with an amaranth hydrolysate that has shown antihypertensive properties *in vivo* [11], as well as the suitability of the developed pasta for lowering systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats.

2. Materials and Methods

2.1. Amaranth Protein Hydrolysis

The amaranth protein hydrolysate was obtained as previously described with minor modifications [11]. Amaranth protein concentrate (COPRAMTM) was suspended in purified water (1:5 *w/v*). The hydrolysis was carried out with food-grade alcalase (0.04 mU/mg of protein content) at 52 °C with continuous stirring for 6.16 h. The enzymatic hydrolysis was stopped by heating the reaction solution (85 °C, 15 min).

2.2. Half-Inhibitory Concentration

Half-inhibitory concentration (IC₅₀) of the hydrolysate was assessed using an ACE-1 Inhibition kit (ACE kit-WST-Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) following the manufacturer's instructions, where the substrate reaction was 3-Hydroxybutylyl-Gly-Gly-Gly. Serial dilutions of the amaranth hydrolysate were prepared and utilized to construct an ACE-1 inhibition curve. The protein concentration of the amaranth hydrolysate was determined using the BCA assay (BCA assay, PierceTM Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The concentration of amaranth hydrolysate required to produce 50% of ACE-1 inhibition was considered as the IC₅₀ and was expressed as mg/mL.

2.3. Pasta Making

Ingredients for pasta making are listed in Table 1. Pasta with three different protein contents were prepared following the official American Association of Cereal Chemists (AACC) method 66-10.01 [15], with modifications in drying steps [16]. Protein concentrations were adjusted, adding amaranth protein concentrate (COPRAMTM) to the standard pasta formulation (pasta A). The ingredients were mixed in a Kitchen Aid mixer (St Joseph, USA) according to the mixing time established in previous mixograms (10 min). The amaranth hydrolysate was gradually added during the mixing time until the final concentration was 4% (*w/w*). The mixture was extruded at room temperature using a pasta maker (Columbian Home Products #330-54, Terre Haute, IN, USA). The pasta products were dried in three steps: (1) 60 °C and 65% relative humidity for 3 h; (2) 40 °C and 30% relative humidity for 5 h (Micropak oven series MP500, Enviro-Pak, Clackamas, OR, USA); and (3) 50 °C for 3 h in an oven (RedLine RF 115 UL, Binder, Tuttlingen, Germany).

Table 1. Formulations for pasta making with changes in the content of protein *.

Ingredients (g)	Pasta A (11% Protein)	Pasta B (15% Protein)	Pasta C (20% Protein)
Semolina	100.00	91.87	57.00
Amaranth protein concentrate	-	8.53	43.00
Amaranth protein hydrolysate	-	4.00	4.00

* Based on the method 66-10.01 of the American Association of Cereal Chemists (AACC), (2001) [15].

2.4. Proximate Composition

The proximate composition was evaluated according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC) methods [17]. Moisture was assessed, drying the products at 105 °C for 24 h (method 925.09B); crude protein was measured using the micro-Kjeldahl assay (method 960.52); lipids were determined by defatting the products in a Soxhlet apparatus using petroleum ether as solvent (method 920.39C); ashes were obtained by incineration at 550 °C (method 923.03); and carbohydrates were calculated by difference of the other macronutrients. All evaluations were carried out in triplicate, and the results expressed in g/100 g dry basis.

2.5. Pasta Cooking Quality, Color, and Texture Evaluations

The technological characteristics of the pasta were evaluated according to the AACC method 66-10.01 [15]. Optimum cooking time was expressed in minutes; cooking loss and weight gain were expressed as g/100 g of pasta. The color parameters of both dried and cooked pasta were measured using a Minolta (Japan) digital colorimeter (CR-400). The results were expressed in the International Commission on Illumination (CIE) LAB space as L* (luminosity, 0 = black, 100 = white), a* (+a = red, -a = green) and b* (+b = yellow, -b = blue). The texture evaluations of cooked pasta were carried out according to the AACC method 74-09.01. Firmness (cutting strength) and adhesiveness were evaluated in cooked pasta using a TA-XTPlus texturometer (Stable Microsystems, Godalming, UK) under the following settings: load cell of 5 kg at test speed of 0.1 mm/s, distance of 1.6 mm, force threshold of 0.01 N, 3 cm strips of pasta. Seven evaluations per product were carried out. A force–distance curve was recorded in the texturometer, and maximum strength was considered as firmness (N). The negative area was recorded as adhesiveness (–N·s).

2.6. Sensory Evaluation

Thirty untrained panelists participated in the sensory analysis. Sensory attributes (color, odor, taste, and texture) and the global appreciation of the products were evaluated in a hedonic scale (0 = totally dislike, 10 = like very much) according to International Standard Organization (ISO)-11136:2014 [18]. A triangle test based on ISO-4120:2004 method [19] was carried out in order to verify the capability of the panelists to discriminate among the three types of pasta (A, B, and C). Each panelist was provided with six sequences of samples (1: A, A, B; 2: A, B, B; 3: A, A, C; 4: A, C, C; 5: B, B, C; and 6: B, C, C). The perceptible difference among the products was evaluated utilizing standardized tables, according to ISO-4120:2004.

2.7. In Vivo Evaluation of the Antihypertensive Properties of the Amaranth Hydrolysate

Groups of six spontaneously hypertensive male rats (12 weeks old, 300–350 g body weight) ate freely 8 g of cooked pasta A (control), B, or C. As a positive control, a fourth group of rats received captopril (25 mg/kg of rat body weight) intragastrically. Blood pressure was monitored before (time zero) and after treatments (at 1 h intervals for 9 h). The CODA™ tail cuff blood pressure monitor (Kent Scientific, Torrington, CT, USA) was utilized. An Ethics Review Board of the University of Sinaloa approved the study protocol (CE-UACNYG-2015-SEP-001).

2.8. Statistical Analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normality tests were carried out using Shapiro–Wilk test. Normally distributed data were expressed as mean and standard deviation. Differences among groups were analyzed using ANOVA and Tukey tests. Non-normally distributed data were expressed as median and interquartile range. Differences among groups were analyzed using Kruskal–Wallis and Dunn’s tests. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Amaranth Protein Hydrolysis and IC₅₀ Estimation

The hydrolysis of amaranth protein with food-grade alcalase generates a hydrolysate with ACE-1 inhibitory activity. The IC₅₀ value of the hydrolysate was 0.014 mg/mL, and 100% of ACE-1 inhibition was seen at 0.88 mg/mL (Figure 1).

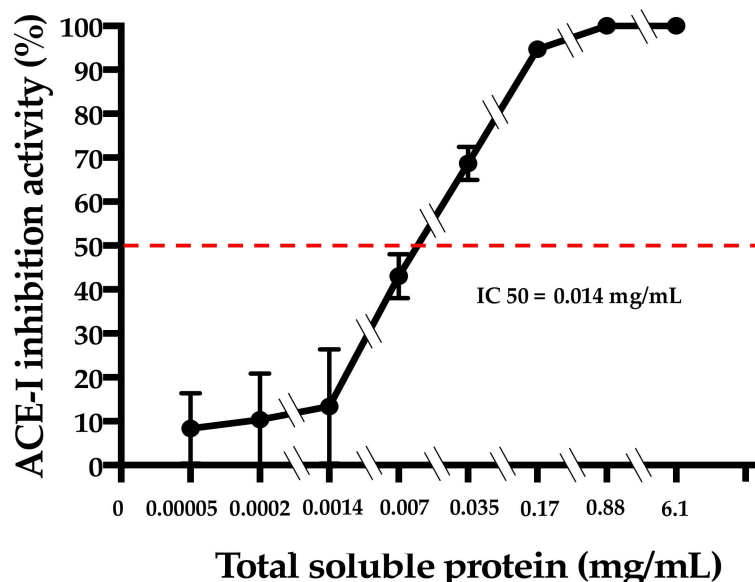


Figure 1. IC₅₀ (half-inhibitory concentration) estimation of the amaranth hydrolysate (optimized hydrolysate parameters: pH 7.01; temperature 52 °C; enzyme concentration 0.04 mU/mg of protein; reaction time 6.16 h). ACE-1: angiotensin-1-converting enzyme.

3.2. Technological Evaluation of Pasta

The results of the proximate analysis are shown in Table 2. As expected, pasta C had the highest protein content (20% dry basis), followed by pastas B (15.0%) and A (11.1%). The optimum cooking time and cooking loss parameters, as well as the weight gain after cooking are shown in Table 3. Optimum cooking time and cooking loss decreased in the pasta with the highest protein content (C) ($p \leq 0.05$). Weight-gain parameters were no different among the products ($p > 0.05$). Color variations in both dry and cooked pasta are shown in Table 4. After cooking, L^* values decreased in pastas B and C ($p \leq 0.05$), but not in the control pasta (A). Both a^* and b^* color parameters varied among the different types of pasta ($p < 0.05$). The development of a brown color was more evident in pastas B and C than in pasta A, either before or after cooking ($p \leq 0.05$).

Table 2. Proximate analysis of the three types of pasta (dry basis).

Sample	Moisture (g/100 g)	Protein (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Carbohydrates (g/100 g)
Pasta A	7.64 ± 0.01 ^a	11.10 ± 0.01 ^a	0.92 ± 0.61 ^a	0.63 ± 0.01 ^a	87.33 ± 2.04 ^c
Pasta B	7.84 ± 0.01 ^a	15.06 ± 0.29 ^b	1.44 ± 0.34 ^b	0.90 ± 0.01 ^a	82.59 ± 0.34 ^b
Pasta C	8.12 ± 0.01 ^a	20.00 ± 0.06 ^c	2.27 ± 0.40 ^b	0.92 ± 0.01 ^a	76.89 ± 0.21 ^a

Comparisons in each column were carried out using ANOVA and Tukey tests. Different superscript letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$). Mean values ± standard deviations are shown. Carbohydrates were calculated by difference.

Table 3. Cooking quality of the three types of pasta.

Sample	Optimum Cooking Time (MIN)	Cooking Loss (G/100 G)	Weight Gain (G/100 G)
PASTA A	10.5 ± 0.5 ^b	11.5 ± 0.5 ^b	207 ± 4.9 ^a
PASTA B	7.5 ± 0.5 ^a	8.9 ± 0.1 ^b	205 ± 6.0 ^a
PASTA C	5.5 ± 0.0 ^a	7.3 ± 1.1 ^a	193 ± 1.0 ^a

Comparisons in each column were carried out using ANOVA and Tukey tests. Different superscript letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$). Mean values ± standard deviations are shown.

Table 4. Color parameters in dry and cooked pasta.

Sample	Presentation	L*	a*	b*
Pasta A	Dry	78.5 ± 0.7 ^d	2.02 ± 0.1 ^a	17.4 ± 0.8 ^b
	Cooked	78.5 ± 1.6 ^d	1.01 ± 0.6 ^a	16.7 ± 0.9 ^a
Pasta B	Dry	72.1 ± 0.5 ^c	4.3 ± 0.2 ^b	21.6 ± 0.5 ^c
	Cooked	56.2 ± 1.2 ^a	7.8 ± 0.2 ^c	24.5 ± 0.5 ^{de}
Pasta C	Dry	60.0 ± 0.3 ^b	7.6 ± 0.2 ^c	24.1 ± 0.3 ^d
	Cooked	55.7 ± 0.6 ^a	8.2 ± 0.2 ^d	25.1 ± 0.4 ^e

Comparisons in each column were carried out using ANOVA and Tukey tests. Different superscript letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$).

Texture was evaluated after cooking of pasta at optimum time. Adhesiveness was inversely correlated to protein content. On the contrary, the firmness of pasta increased as the protein content was augmented ($p < 0.05$) (Table 5).

Table 5. Texture characteristics of the three types of pasta after cooking.

Sample	Firmness (N)	Adhesiveness (–N·S)
Pasta A	3.31 ± 0.26 ^a	0.053 ± 0.011 ^a
Pasta B	3.64 ± 0.77 ^b	0.043 ± 0.010 ^b
Pasta C	5.73 ± 0.75 ^c	0.041 ± 0.007 ^c

Comparisons in each column were carried out using ANOVA and Tukey tests. Different superscript letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$). Mean values ± standard deviations are shown.

3.3. Sensory Evaluation

Pasta A (control pasta) scored better global appreciation and *taste* than pastas B and C, however, significant differences ($p < 0.05$) were observed for global appreciation only (Figure 2). Regarding color, odor, and texture, there were no significant differences ($p > 0.05$) among the three types of pasta. Triangle test was performed to evaluate if the panelists were able to distinguish one type of pasta from another. Overall, all the sequences of products evaluated were distinguishable from each other ($p < 0.05$) (Figure 3).

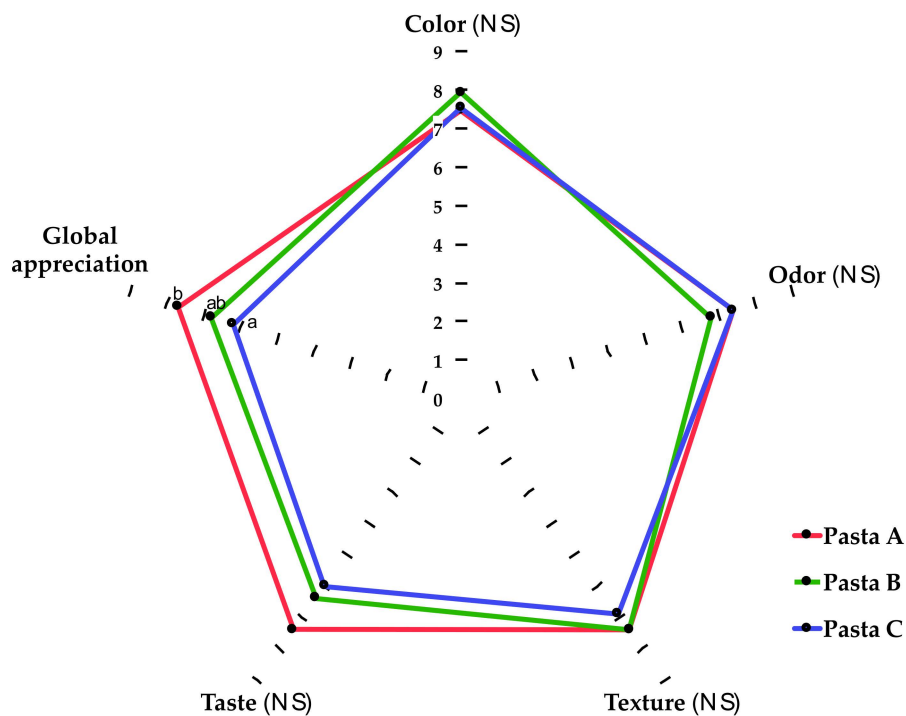


Figure 2. Sensory evaluation of cooked pasta. A hedonic scale was used, where 0 = totally dislike and 10 = like very much. Comparisons in each sensory attribute were carried out using ANOVA and Tukey tests. Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$). NS: nonsignificant difference.

Pasta Samples	Sequences	Correct responses/Total panelists	Statistical analysis
A vs. B	1: A+B+B 2: B+A+A	41/60	$p < 0.05$ Pasta A and B were distinguishable from each other.
A vs. C	3: A+C+C 4: C+A+A	45/60	$p < 0.05$ Pasta A and C were distinguishable from each other.
B vs. C	5: B+C+C 6: C+B+B	41/60	$p < 0.05$ Pasta B and C were distinguishable from each other.

Figure 3. Triangle test to evaluate the capability of the panelists to discriminate among pasta samples. Sixty untrained panelists were recruited. Pastas (A, B, C) were assigned a code and presented simultaneously to all panelists. In each sample sequence, two equal pastas and one different pasta were given to panelists. Statistical differences were estimated according to ISO-4120:2004.

3.4. Supplemented Pasta Efficiently Reduces Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats

The baseline of blood pressure in spontaneously hypertensive rats was 199.33 ± 20.90 mmHg. Compared with control pasta, blood pressure was significantly reduced ($p < 0.05$) after 3 h of the ingestion of pasta B or C (both containing the amaranth hydrolysate) (Figure 4). The drug captopril showed more potent antihypertensive properties than the three types of pasta tested ($p < 0.05$) (Figure 4). Compared with control pasta, the blood pressure reduction was maintained for 7 h or 8 h in the groups supplemented with pasta B or C, respectively ($p < 0.05$). Captopril maintained its antihypertensive effect until the last evaluation of blood pressure, 9 h after captopril administration (Figure 4).

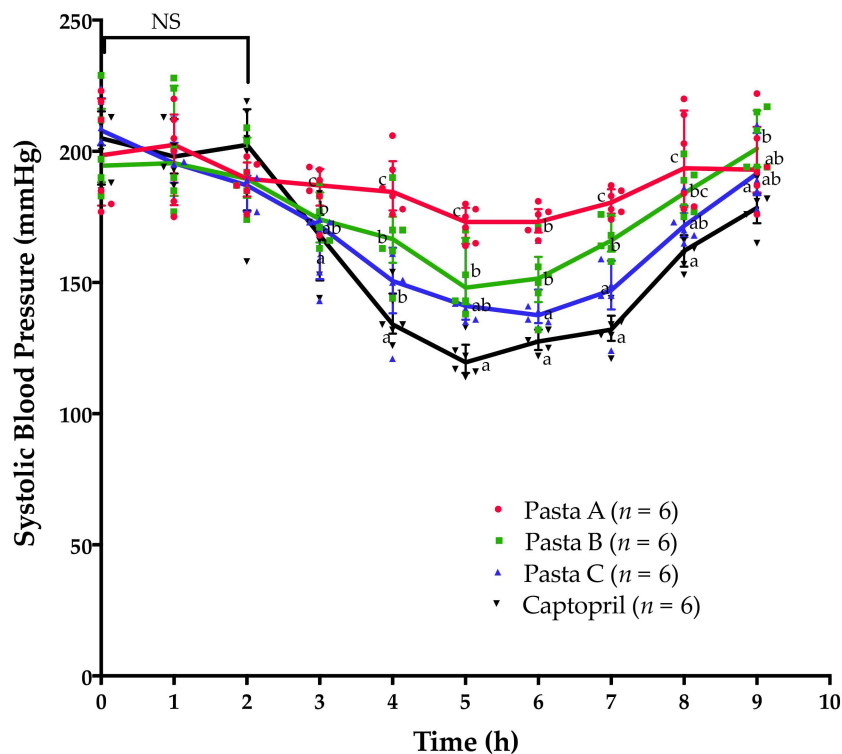


Figure 4. Systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats after supplementation with three types of pasta and captopril. Comparisons at each time point were carried out using nonparametric ANOVA and Kruskal–Wallis test. Different letters at specific time points mean significant difference ($p < 0.05$). NS: nonsignificant difference.

4. Discussion

In this study, the antihypertensive properties of an amaranth hydrolysate incorporated into a food matrix with different protein content were evaluated. The optimized hydrolysis conditions of amaranth protein with alcalase to generate an antihypertensive hydrolysate were previously established by our research group [11]. However, in this case, only food-grade reagents were utilized to hydrolyze amaranth protein. Although the IC₅₀ value of the amaranth hydrolysate generated in this study (0.014 mg/mL) was higher than the IC₅₀ value of captopril (0.0435E4 mg/mL; calculated by the manufacturer of the ACE-1 inhibition kit utilized), it was almost tenfold lower than the IC₅₀ values reported by others who utilized the same enzyme and source of proteins [20]. This can be attributed to differences in the hydrolysis conditions. In fact, the hydrolysis degree of amaranth protein under the conditions used in the present study is 75% [9], while others reported hydrolysis degrees between 45% and 65% [20]. This is of relevance as di-, tri-, and tetra-peptides are the best ACE-1 inhibitory peptides, and these are preferentially generated after exhaustive proteolysis [9].

The antihypertensive peptides were added into pasta formulations with different protein content. The addition of protein proportionally reduces the starch content of the food matrix (Figure 2), and this reduction could impact on cooking time. As starch gelatinization during cooking is related to the optimum cooking time, this parameter decreased as the protein content of the pastas increased (Table 3). This is in line with previous studies [21]. On the other hand, cooking loss is related to the structural characteristics of the pasta matrix. Compared with conventional pasta formulation, cooking loss can either increase or decrease after the incorporation of additional ingredients [13,16]. This could be related to molecular rearrangements, which organize the microstructure of the matrix, making it more prone to tolerate cooking stresses [22]. A similar effect was previously reported in pastas enriched with microalgae biomass [13].

Regarding color analyses (Table 4), luminosity (L^*) decreased in pastas as the protein content increased. The brown color developed in the pastas enriched with amaranth protein can be attributed to Maillard reactions, which occurred during pasta processing [23–25]. Maillard reactions require reducing sugars and free amino groups to occur. These amino groups could be more accessible in pastas supplemented with protein hydrolysates. The hydrolysate-containing pastas were also supplemented with nongluten proteins. Reducing the proportion of gluten proteins in the formulation commonly decreases the pasta firmness since the network can lose strength and the overall microstructure of the pasta is disrupted [26]. However, in the present study, the firmness of cooked pasta increased as the protein content increased as well. This improvement in firmness could be caused by the nature of the added protein and the heat treatment during drying steps, as previously reported [16].

Sensory assessment (Figure 2) indicated that color, odor, and texture values of the supplemented pastas were very close to the control pasta, but significant differences ($p < 0.05$) in the global appreciation were observed. The consumers did not find significant differences ($p > 0.05$) between the tastes of the pastas. Changes in sensory attributes were expected as the percentage of the ingredient (100 g of semolina) of the control pasta changed by 12.0% in pasta B (104.4 g total; 91.8 g of semolina) and by 45.2% in pasta C (104.0 g total; 57.0 g of semolina). This observation is based on a meta-analysis study, which indicates that enrichment levels above 10% significantly decrease the acceptance of supplemented pastas [27].

Systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats significantly decreased ($p < 0.05$) after 3 h of the ingestion of supplemented pastas compared with control pasta (Figure 4). Previous studies stated that orally administered antihypertensive peptides and captopril can reduce the blood pressure in spontaneously hypertensive rats, but the antihypertensive effect can be observed only after 3 h postsupplementation [28]. Our results support these findings and also show that similar to the oral administration of the amaranth hydrolysate per se [11], the most pronounced antihypertensive effects after the ingestion of amaranth-hydrolysate-supplemented pasta are observed between 5 h and 6 h. Furthermore, the results suggest that the protein content could play an important role for improving the antihypertensive performance of pasta enriched with amaranth hydrolysates. The antihypertensive effect was more evident in the group of animals fed with the supplemented pasta containing the highest proportion of protein (pasta C). Others have stated that food matrices with increased protein content can delay the release and absorption of functional compounds [12]. The data presented here and obtained in spontaneously hypertensive rats hardly support this notion, as the antihypertensive effect was lost after 9 h of the ingestion of any of the supplemented pastas. Furthermore, 8 h after the administration of the supplemented pastas, the antihypertensive effects were not statistically significant ($p > 0.05$). It can be hypothesized that the addition of protein induces molecular rearrangements of the food matrix microstructure [9], entrapping more efficiently the antihypertensive molecules generated during the digestion of amaranth proteins with alcalase. Supporting this, our results show that the addition of protein increases firmness, which can contribute to entrap the antihypertensive molecules in the food matrix during cooking.

In addition to the hydrolysate, the pastas evaluated were enriched with amaranth protein concentrate to increase their protein content. The simulated gastrointestinal digestion of amaranth protein concentrates generates ACE-1 inhibitory compounds [29], but the IC_{50} values reported for these hydrolysates are 31.1 fold higher than the IC_{50} value of the amaranth hydrolysate utilized in the present study. Similarly, the daily consumption of 0.38 g of amaranth protein concentrate incorporated into a food matrix can help to reduce blood pressure in rats after 4 weeks [30]. In our study and considering the weight gain of the pasta after cooking, the rats were fed only once with 8 g of cooked pasta, which is equivalent to 0.22 g or 1.14 g of amaranth protein concentrate, and the blood pressure measurements were carried out within the following 9 h. Under these experimental conditions, readily detected antihypertensive effects are not expected due to the intake of amaranth protein concentrate, which suggests that a food matrix enriched with the optimized amaranth hydrolysate obtained with alcalase significantly reduces the blood pressure in hypertensive rats after the first hours of its intake.

5. Conclusions

Amaranth hydrolysates obtained with alcalase have antihypertensive properties, which can be maintained after the hydrolysates incorporation into pasta. Moreover, the antihypertensive amaranth molecules incorporated maintain their bioavailability after pasta ingestion and efficiently reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Although some sensory attributes of the amaranth-hydrolysate-supplemented pasta need to be addressed in order to improve the consumer acceptance, the effectiveness of amaranth hydrolysates for lowering blood pressure justifies further studies to evaluate their safety and use as an ingredient for functional foods development.

Author Contributions: Conceptualization, N.O. and F.C.-C.; Data curation, O.G.F.-S., S.O., I.d.S. and F.I.C.-T.; Formal analysis, A.R., S.O., I.d.S., F.I.C.-T., A.R.I.-R. and N.O.; Funding acquisition, F.C.-C.; Investigation, E.E.V.-M. and M.S.-J.; Methodology, E.E.V.-M., O.G.F.-S. and G.I.R.-T.; Project administration, F.C.-C.; Resources, F.C.-C.; Supervision, F.C.-C.; Visualization, F.I.C.-T.; Writing—original draft, E.E.V.-M.; Writing—review & editing, A.R., O.G.F.-S., P.F., S.O., I.d.S., M.S.-J., F.I.C.-T., A.R.I.-R., G.R.-O., N.O. and F.C.-C.

Funding: This research was funded by Universidad Autónoma de Sinaloa, grant number PROFAPI2015/049 and by Portuguese funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) through the research unit UID/AGR/04129/2013 (LEAF).

Acknowledgments: We acknowledge the postgraduate fellowships given to E.E.V.-M., G.I.R.-T., and F.I.C.-T., by the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. ILSI North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion. Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1999**, *39*, 203–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hasler, C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* **2018**, *132*, 3772–3781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hassellund, S.S.; Flaa, A.; Kjeldsen, S.E.; Seljeflot, I.; Karlsen, A.; Erlund, I.; Rostrup, M. Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: A double-blind randomized placebo-controlled crossover study. *J. Hum. Hypertens.* **2013**, *27*, 100–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Maaliki, D.; Shaito, A.A.; Pintus, G.; El-Yazbi, A.; Eid, A.H. Flavonoids in hypertension: a brief review of the underlying mechanisms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *45*, 57–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Aluko, R.E. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2015**, *6*, 235–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Iwaniak, A.; Minkiewicz, P.; Darewicz, M. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 114–134. [[CrossRef](#)]
7. Mirzapour, M.; Rezaei, K.; Sentandreu, M.A. Identification of Potent ACE Inhibitory Peptides from Wild Almond Proteins. *J. Food Sci.* **2017**, *82*, 2421–2431. [[CrossRef](#)]
8. Grootaert, C.; Matthijs, B.; Voorspoels, S.; Possemiers, S.; Smagghe, G.; Van Camp, J. Egg-derived bioactive peptides with ACE-inhibitory properties: A literature update. *Food Funct.* **2017**, *8*, 3847–3855. [[CrossRef](#)]
9. Ramírez-Torres, G.I.; Ontiveros, N.; Lopez-Teros, V.; Suarez-Jiménez, G.M.; Cabrera-Chávez, F. Food Matrices for the Delivery of Antihypertensive Peptides in Functional Foods. *Biotecnia* **2018**, *20*, 165–169.
10. Vermeirssen, V.; Van Camp, J.; Verstraete, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nutr.* **2004**, *92*, 357–366. [[CrossRef](#)]
11. Ramírez-Torres, G.; Ontiveros, N.; Lopez-Teros, V.; Ibarra-Diarte, J.A.; Reyes-Moreno, C.; Cuevas-Rodríguez, E.O.; Cabrera-Chávez, F. Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules* **2017**, *22*, 1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ten Have, G.A.M.; Van Der Pijl, P.C.; Kies, A.K.; Deutz, N.E.P. Enhanced lacto-tri-peptide bio-availability by co-ingestion of macronutrients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Fradique, M.; Batista, A.P.; Nunes, M.C.; Gouveia, L.; Bandarra, N.M.; Raymundo, A. Isochrysis galbana and Diacronema vlkianum biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT-Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 312–319. [[CrossRef](#)]
14. Martínez-Maqueda, D.; Miralles, B.; Recio, I.; Hernández-Ledesma, B. Antihypertensive peptides from food proteins: A review. *Food Funct.* **2012**, *3*, 350–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. American Association of Cereal Chemists (AACC). *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*, 10th ed.; The Association: St. Paul, MN, USA, 2001.
16. Islas-Rubio, A.R.; de la Barca, A.M.C.; Cabrera-Chávez, F.; Cota-Gastélum, A.G.; Beta, T. Effect of semolina replacement with a raw: popped amaranth flour blend on cooking quality and texture of pasta. *LWT-Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 217–222. [[CrossRef](#)]
17. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, 1999.
18. International Standard Organization (ISO). *Sensory Analysis-Methodology-General Guidance for Conducting Hedonic Tests with Consumers in a Controlled Area*; BS ISO 11136:2004; International Standard Organization of the British Standard: London, UK, 2004.
19. International Standard Organization (ISO). *Sensory Analysis-Methodology-Triangle Test*; BS ISO 4120:2004; International Standard Organization of the British Standard: London, UK, 2004.
20. Fritz, M.; Vecchi, B.; Rinaldi, G.; Añón, M.C. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem.* **2011**, *126*, 878–884. [[CrossRef](#)]
21. Fuad, T.; Prabhasankar, P. Role of ingredients in pasta product quality: A review on recent developments. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 787–798. [[CrossRef](#)]
22. Cabrera-Chávez, F.; de la Barca, A.M.; Islas-Rubio, A.R.; Marti, A.; Marengo, M.; Pagani, M.A.; Bonomi, F.; Iametti, S.; Calderón de la Barca, A.M.; Islas-Rubio, A.R.; et al. Molecular rearrangements in extrusion processes for the production of amaranth-enriched, gluten-free rice pasta. *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 421–426. [[CrossRef](#)]
23. Anese, M.; Nicoli, M.C.; Massini, R.; Lerici, C.R. Effects of drying processing on the Maillard reaction in pasta. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 193–199. [[CrossRef](#)]
24. De Noni, I.; Pagani, M.A. Cooking properties and heat damage of dried pasta as influenced by raw material characteristics and processing conditions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 465–472. [[CrossRef](#)]
25. Hellwig, M.; Kühn, L.; Henle, T. Individual Maillard reaction products as indicators of heat treatment of pasta—A survey of commercial products. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *72*, 83–92. [[CrossRef](#)]
26. Rayas-Duarte, P.; Mock, C.M.; Satterlee, L.D. Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth, and lupin flours. *Cereal Chem.* **1996**, *73*, 381–387.
27. Mercier, S.; Moresoli, C.; Mondor, M.; Villeneuve, S.; Marcos, B. A Meta-Analysis of Enriched Pasta: What Are the Effects of Enrichment and Process Specifications on the Quality Attributes of Pasta? *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 685–704. [[CrossRef](#)]
28. Matsui, T.; Zhu, X.L.; Watanabe, K.; Tanaka, K.; Kusano, Y.; Matsumoto, K. Combined administration of captopril with an antihypertensive Val-Tyr di-peptide to spontaneously hypertensive rats attenuates the blood pressure lowering effect. *Life Sci.* **2006**, *79*, 2492–2498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tiengo, A.; Faria, M.; Netto, F.M. Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, H121–H126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lado, M.B.; Burini, J.; Rinaldi, G.; Añón, M.C.; Tironi, V.A. Effects of the Dietary Addition of Amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) Protein Isolate on Antioxidant Status, Lipid Profiles and Blood Pressure of Rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, *70*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

