

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE PROCESAMIENTO Y DE UNA
DIGESTIÓN *IN VITRO* SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE HIDROLIZADOS
DE PROTEÍNAS DE *Amaranthus hypochondriacus* L.**

TESIS

QUE PRESENTA

M.C.B. JENNIFER LÓPEZ SÁNCHEZ

MATRÍCULA 2123800708

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR: DR. JORGE SORIANO SANTOS

JURADO:

Dra. Edith Ponce Alquicira

Dra. María Belem Arce Vázquez

Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Iztapalapa, Ciudad de México, agosto 2021.

Agradecimientos

A mis padres por su infinito e incondicional amor, por su ejemplo siempre congruente, por los valores inculcados, gracias por cada momento de felicidad y por siempre impulsar mi desarrollo personal y profesional.

A mis hermanos Samantha, Josué y Caro por siempre estar.

A Odín, por alentarme siempre a cerrar este ciclo académico.

A mi director de tesis Dr. Jorge Soriano Santos, gracias por el aprendizaje, por compartir su conocimiento y experiencia.

A las Dras. Edith Ponce y Ruth Pedroza por la asesoría y aportaciones para la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Escalona, por sus acertados comentarios y valiosa contribución al trabajo de investigación.

Al Dr. Rafael Angel Cuapio y a la Dra. Belén Arce por la revisión del escrito.

Dedicatoria

A mis padres con todo el amor y respeto que siento por ellos. ¡Siempre han sido y serán la luz que alegra y da felicidad a mi vida! ¡Los amo y admiro infinitamente!

El doctorado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de calidad (PNPC) del CONACYT con la referencia 001466.

Esta investigación se realizó en el laboratorio de la planta piloto No. 1 “Nutracéuticos y alimentos funcionales” del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

PUBLICACIÓN

López-Sánchez J. Ponce-Alquicira E. Pedroza-Islas R. De la Peña-Díaz A. Soriano-Santos J. 2016. Effects of heat and pH treatments and in vitro digestion on the biological activity of protein hydrolysates of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. J Food Sci Technol. 53(12):4298–4307.

Resumen

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar los efectos de la temperatura (T), tiempo (t), pH, así como una digestión *in vitro* sobre la estabilidad de las siguientes actividades: actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (AIECA), actividad antitrombótica (AAT) evaluada como la inhibición de la agregación plaquetaria, actividad quelante de Fe^{2+} (AQF), actividad quelante de Cu^{2+} (AQC) y actividad antioxidante (AAO) de hidrolizados de proteína seleccionados de amaranto denominados Alb1H103, Alb1H88, Alb1H24, GloH24 y GloH88. La estabilidad frente al tratamiento térmico (40-100 °C) durante 1h a pH 4.0 y 7.0 no mostró diferencias significativas para todas las actividades ensayadas. El efecto del pH (2.0-10.0) sobre las bioactividades fue insignificante en la AIECA Y AAT, sin embargo, para la AAO, AQC y AQF disminuyó ligeramente a pHs fuertemente ácidos y alcalinos. La prueba de digestión *in vitro* se realizó con pepsina (p), tripsina (T) y α -quimiotripsina (Q). al utilizar la pepsina como tratamiento previo de los hidrolizados provocó una mejor actividad proteolítica de la T y Q; de forma general, los hidrolizados a 100° C por 1 hora a pH 4, mostró un aumento significativo para cada una de las bioactividades ensayadas. Contrariamente a lo ocurrido a pH 7.0, no hubo diferencia significativa. Por tanto, en este trabajo de investigación la actividad biológica de los hidrolizados se conservó o mejoró dependiendo de las condiciones de procesamiento.

Abstract

This research work aimed to evaluate the effects of temperature (T), time (t), pH, as well as an *in vitro* digestion on the stability of the following activities: inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (AIECA), antithrombotic activity (AAT) evaluated as the inhibition of platelet aggregation, Fe²⁺ chelating activity (AQF), Cu²⁺ chelating activity (AQC) and antioxidant activity (AAO) of selected protein hydrolysates of amaranth called Alb1H103, Alb1H88, Alb1H24, GloH24 and GloH88. Stability against heat treatment (40-100 ° C) for 1h at pH 4.0 and 7.0 did not show significant differences for all the activities tested. The effect of pH (2.0-10.0) on bioactivities was negligible in AIECA and AAT, however, for AAO, AQC and AQF it decreased slightly at strongly acidic and alkaline pHs. The *in vitro* digestion test was performed with pepsin (p), trypsin (T) and α -chymotrypsin (Q). When using the pepsin as a previous treatment of the hydrolysates, it caused a better proteolytic activity of the T and Q; in general, the hydrolysates at 100 ° C for 1 hour at pH 4, showed a significant increase for each of the bioactivities tested. Contrary to what happened at pH 7.0, there was no significant difference. Therefore, in this research work the biological activity of the hydrolysates was conserved or improved depending on the processing conditions.

Contenido

Acrónimos	1
Introducción.....	2
Antecedentes	3
Amaranto (<i>Amarathus sp</i>).....	5
Proteínas de la semilla de amaranto.....	6
Hidrólisis enzimática.....	6
Grado de hidrólisis	7
Distribución de peso molecular	7
Actividades biológicas	8
Inhibidores de ECA.....	8
Péptidos antioxidantes.....	9
Péptidos quelantes de metales.....	9
Péptidos antitrombóticos.....	10
Alimentos funcionales.....	11
Justificación	11
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	13
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares.....	13
Materiales y métodos.....	14
Molienda de los granos de amaranto.....	14
Desengrasado de harina de amaranto.....	14
Extracción de albúmina 1 y globulina con Na ₂ SO ₄	14
Hidrólisis enzimática con alcalasa.....	15

Determinación del grado de hidrólisis mediante los grupos amino terminal.....	16
Determinación de inhibición de serinproteasas.....	16
Evaluación de la capacidad inhibitoria de la ECA.....	16
Capacidad de reducción del radical DPPH.....	18
Capacidad de reducción del radical ABTS.....	18
Actividad quelante de Cu ²⁺	18
Actividad quelante de Fe ²⁺	19
Determinación de la actividad antitrombotica.....	19
Determinación del IC ₅₀	20
Condiciones de tratamientos.....	20
Estabilidad frente a proteasas gástricas <i>in vitro</i>	20
Análisis estadístico.....	20
Resultados.....	21
Grado de hidrolisis.....	21
Inhibición de serin proteasas.....	23
Actividad inhibitoria de la ECA.....	30
Actividad antitrombótica AAT.....	33
Actividad quelante (AQ).....	34
Actividad antioxidante (AAO).....	38
Evaluación de condiciones de tratamiento.....	42
Efecto del tratamiento térmico sobre actividades biológicas.....	43
Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre la AIECA.....	43
Efecto del tratamiento térmico sobre la actividad quelante.....	50
Efecto del tratamiento térmico sobre la AAO.....	56
Efecto del pH sobre las actividades biológicas de las proteínas de <i>A. hypochondriacus</i>	62

Efecto del pH sobre la actividad inhibitoria de la ECA y AAT.....	62
Efecto del pH sobre AAO.....	64
Efecto del pH sobre la actividad quelante de Cu^{2+} y de Fe^{2+}	66
Efecto de una simulación digestiva gastrointestinal sobre la actividad inhibitoria de la ECA y AA.....	69
Conclusiones.....	76
Anexos.....	78
Referencias.....	81

Contenido de figuras

Figura 1. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis alcalina.....	15
Figura 2. Reacción de la ECA con HHL formando ácido hipúrico.....	17
Figura 3. Valores IC_{50} de la actividad inhibitoria de serin proteasas de las fracciones proteicas (Alb1 y G) de almacenamiento de <i>A. hypochondryacus</i>	24
Figura 4. Perfil electroforetico en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de A1 y G de <i>A. hypochondryacus</i>	26
Figura 5. Cromatografía por filtración en Sephadex C-50 de alb1(A) y de G (B) de <i>Amarathus hypochondriacus</i>	28
Figura 6. Perfil electroforético SDS-PAGE de fracciones de A1 de <i>A. hypochondriacus</i> obtenidas por filtración en gel.....	29
Figura 7. Perfil electroforético SDS-PAGE de fracciones de G de <i>A. hypochondriacus</i> obtenidas por filtración en gel.....	29

Figura 8. Valor de IC ₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (a) y pH 7.0 (b) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AIECA.	44
Figura 9. Valor de IC ₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (a) y pH 7.0 (b) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AAT.....	45
Figura 10. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 ° C a pH 4.0 y 7.0 en la AIECA.....	48
Figura 11. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 ° C a pH 4.0 y 7.0 en la AAT.....	49
Figura 12. Valor de IC ₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (b) y pH 7.0 (a) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AQC.....	51
Figura 13. Valor de IC ₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (b) y pH 7.0 (a) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AQF.....	52
Figura 14. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 ° C a pH 4.0 y 7.0 en la AQC.....	54
Figura 15. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 ° C a pH 4.0 y 7.0 en la AQF.....	55
Figura 16. Valor de IC ₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 y pH 7.0 durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AAO.	57
Figura 17. Valor de IC ₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 y pH 7.0 durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AAO.....	58

Figura 18. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 ° C a pH 4.0 y 7.0 en la AAO.....	60
Figura 19. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 ° C a pH 4.0 y 7.0 en la AAO.....	61
Figura 20. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del pH (2-12) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 C durante 1 h sobre sus AIECA y AAT.....	63
Figura 21. Valor de CI ₅₀ como resultado del efecto del pH (2-12) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 C durante 1 h sobre su AAO (DPPH y ABTS).....	65
Figura 22. Valor ICI ₅₀ como resultado del efecto del pH (2-12) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 C durante 1 h sobre sus AQC Y AQF.....	68
Figura 23. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de péptido fracciones en AIECA, seguido de una prueba gastrointestinal <i>in vitro</i>	70
Figura 24. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto en AAT, seguido de una prueba gastrointestinal <i>in vitro</i>	71
Figura 25. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto en AQC, seguido de una prueba gastrointestinal <i>in vitro</i>	71
Figura 26. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto en AQF, seguido de una prueba gastrointestinal <i>in vitro</i>	72

Figura 27. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto en AAO, seguido de una prueba gastrointestinal <i>in vitro</i>	72
Figura 28. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto en AAO, seguido de una prueba gastrointestinal <i>in vitro</i>	73
Figura 29. Curva estándar para la determinación de proteína verdadera.....	78
Figura 30. Curva estándar para la determinación de grupos amino libres.....	79
Figura 31. Curva estándar de trolox para la evaluación de reducción del radical DPPH.....	80
Figura 32. Curva estándar de trolox evaluación de reducción del radical ABTS.....	80

Contenido de tablas

Tabla 1. Grado de hidrólisis de las proteínas de almacenamiento del grano de <i>A. hypochondriacus</i> L. utilizando alcalasa.....	22
Tabla 2. Actividad Inhibitoria de la ECA.....	31
Tabla 3. Actividad antitrombótica.....	34
Tabla 4. Actividades quelantes de hidrolizados de Cu^{2+} y Fe^{2+}	35
Tabla 5. Actividad antioxidante.....	40

Acrónimos

AAO	Actividad antioxidante
AAT	Actividad antitrombótica
ADP	Adenosín difosfato
AF	Alimento funcional
AQC	Actividad quelante de cobre
AQF	Actividad quelante de hierro
ABTS	Ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico)
A1	Albúmina 1
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
ECA	Enzima Convertidora de angiotensina
G	Globulina
GH	Grado de hidrólisis
IF	Ingredientes funcionales
Q	α -Quimiotripsina
T	Tripsina
P	Pepsina
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas

Introducción

Las proteínas de los alimentos de origen animal, vegetal y fúngico aportan al organismo los aminoácidos requeridos para el funcionamiento de las células de los organismos. En el área de la biotecnología de los alimentos las proteínas no solo son fuente de aminoácidos, sino fuente para la obtención de péptidos con diversas actividades biológicas (antihipertensivas, hipoglucemiantes, antioxidantes, inmunomoduladoras entre otras). Estos péptidos pueden ser adicionados a matrices alimentarias, para la formulación de alimentos funcionales (AF) (Mulero-Cánovas, 2011).

Estos péptidos bioactivos se han definido como secuencias de aminoácidos (a.a) con actividad biológica. Se caracterizan por ser péptidos de pequeño tamaño de entre 3-20 a.a. aproximadamente. Para la obtención de estos, es necesario llevar a cabo un proceso denominado hidrólisis, a través del cual se generan diversos péptidos con diferente estructura química con la capacidad para ejercer variadas actividades biológicas en función de su estructura. (Mulero-Cánovas, 2011). La obtención de péptidos bioactivos de diversas fuentes proteicas se ha realizado a través de fermentación, hidrólisis química e hidrólisis enzimática, siendo la hidrólisis enzimática la más utilizada.

Por otra parte, los péptidos bioactivos deben ser sometidos a diversas condiciones de tratamientos de procesamiento de alimentos como: temperatura, pH, presión entre otros, ya que estos deben conservar su estabilidad para ser considerados ingredientes funcionales para el diseño de AF.

Este trabajo de investigación está enfocado en evaluar las actividades biológicas presentes en las fracciones proteicas del grano de *Amaranthus hypochondryacus*, así como su estabilidad bajo diversas condiciones de proceso de alimentos.

Antecedentes

Actualmente, en México existe un interés en el desarrollo de alternativas enfocadas para disminuir la prevalencia e incidencia de enfermedades consideradas problemas de salud pública. Una alternativa está en los alimentos funcionales (AF) los cuales tienen beneficios nutrimentales más allá de los intrínsecos, es decir, con beneficios específicos para la salud. El diseño y producción de este tipo de alimentos requiere ingredientes con bioactividades: antihipertensivas, hipoglucemiantes, antioxidantes, inmunomoduladoras, antitrombóticas, entre otras. Por lo cual, en la búsqueda de ingredientes funcionales (IF) se han investigado proteínas de diversas fuentes: animales, vegetales y fúngicas para producir polipéptidos bioactivos que puedan ser utilizados como IF.

En este sentido se han evaluado diversos péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas para ser utilizados para el diseño de AF y nutraceuticos. Tan solo en el 2014 Singh et al reportan más de 1500 diferentes péptidos bioactivos en la base de datos Biopep, por su parte Maestrí et al (2018) realizaron un metaanálisis, en el cual reportan 807 péptidos bioactivos de origen animal, respecto a los péptidos de origen vegetal también son numerosos los reportes siendo los más estudiados los generados con soya, frijol, lenteja, arroz y amaranto (Akilloglu y Karakaya, 2009; García Mora et al., 2016; Sabbione et al., 2015). Entre las bioactividades reportadas se encuentran: actividades antihipertensivas, antimicrobianas, antivirales, opiáceas, antitrombóticas, embriotóxicas, inhibidoras de proteasas, inmunoestimuladoras e inmunomoduladoras. Sin embargo, las actividades más conocidas y extendidas son: la antihipertensiva particularmente la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), antioxidante, antimicrobiana, de inhibición de la DPP-IV; un aspecto relevante de mencionar es la escasez de investigaciones respecto a las actividades quelantes y antitrombóticas respecto a las otras actividades biológicas (Mendoza-Figueroa et al., 2018; Meilingo Qiao et al., 2018; Rui Liu et al., 2019; Li Hao et al., 2020; Ifeoluwa Adegbola et al., 2020).

Entre las especies vegetales de interés destacan las del género *Amaranthus*, no solo por la facilidad de su cultivo, sino por las diversas ventajas nutricionales que presenta, sobre

todo su alto contenido en proteínas en comparación con otros cereales. De la planta de amaranto se pueden aprovechar los tallos, las hojas y la semilla conocida coloquialmente como grano de amaranto.

La semilla del amaranto además de ser relevante por sus propiedades nutricionales, lo es también por ser fuente de péptidos bioactivos. Existen diversos reportes sobre las diferentes bioactividades en el género *Amaranthus*; Tovar et al., (2009) reportan actividad inhibitoria de la ECA, (2016); por su parte, Soriano-Santos y Escalona Buendía (2015), evaluaron la actividad antioxidante e inhibitoria de la ECA, así como las propiedades tecno funcionales de los hidrolizados; ambos estudios en la especie *Amaranthus hypochondriacu*. En otras especies como *Amaranthus mantegazzianus*, Sabbione et al., (2016) trabajaron sobre la actividad antitrombótica; en *A. hypochondriacus* incluso se han realizado estudios *in silico* como el realizado por Nardo (2017). A partir de estos estudios los investigadores reportan a los péptidos bioactivos del amaranto como ingredientes funcionales potenciales para el diseño de AF y nutraceuticos.

No obstante, para el diseño de alimentos funcionales es crucial la estabilidad de los péptidos bioactivos, ya que existen diversos factores que influyen en su estabilidad, como las condiciones de procesamiento utilizadas durante la elaboración del alimento, hasta su estabilidad frente a las proteasas gástricas, al ser administrado. En este sentido, hasta hace algunos años los estudios sobre la estabilidad de péptidos eran escasos, la mayoría enfocados en las actividades antihipertensivas y antioxidantes como los realizados por Akilloğlu y Karakaya (2009) sobre la actividad inhibitoria de la ECA de péptidos de frijol común, frijol pinto y lentejas verdes, frente a un tratamiento térmico de 121.1°C durante 30 min la actividad disminuyó, pero por 50 min la actividad aumentó, posteriormente después de una digestión gastrointestinal *in vitro*, la actividad aumentó. También García-Mora et al. (2016) evaluaron la influencia en semillas de lenteja (*Lenus culinaris*) tanto de la AIECA como de la AAO, y en ambas aumentó la actividad de los péptidos. En péptidos de origen animal está el realizado por Hwang (2009) en péptidos de atún, encontrando estabilidad en condiciones de pH en rangos de 2.0 a 10.0, bajo tratamiento térmico de 20 a 100°C y una simulación gastrointestinal, la AIECA se mantuvo en un 95 a 99 %. encontrando una correlación entre

la estructura y el efecto, dependiendo de la posición de los aminoácidos, en la primera y penúltima posición.

Como se mencionó anteriormente, las investigaciones en la especie *Amaranthus hypochondriacus* es diversa en cuanto a las bioactividades que presenta: AIECA, AAO y AAT. No obstante, es necesario tener información específica sobre las condiciones que influyen en su estabilidad. Por ende, la siguiente investigación, está enfocada en evaluar la estabilidad de los péptidos bioactivos de *A. hypochondriacus* bajo diversas condiciones de proceso de alimentos, para poder ser utilizados como ingredientes funcionales. Además, se evalúa su actividad quelante tanto de cobre como de hierro, actividades que hasta el momento no han sido evaluadas.

Amaranto (*Amaranthus sp*)

El amaranto es una planta perteneciente al género *Amaranthus* con aproximadamente 70 especies (Sánchez del Pino et al., 2019). En México las especies con mayor relevancia económica son: *A. caudatus L.*, *A. cruentus L.* y *A. hypochondriacus L.*

Anteriormente se mencionó que exceptuando la raíz se pueden aprovechar todas las estructuras de la planta como alimento. No obstante, para los fines de este trabajo de investigación solo nos enfocaremos a las semillas.

Las semillas de amaranto se caracterizan por su tamaño entre 1 y 2 mm de diámetro en forma de discos, el color varía en función de la especie, en el caso específico de *A. hypochondriacus* son de color blanquecino. El componente mayoritario en la semilla es el almidón (50-60 %, en peso seco); respecto a las proteínas contiene aproximadamente 15.8-20 %; con mayores niveles de lisina (aminoácido esencial) en comparación con otros cereales (Barba de la Rosa et al., 1992; Soriano-Santos y Avedaño Martínez 2013; Mendoza Figueroa et al., 2018). Así mismo, contiene ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados y elevados niveles de escualeno (Berganza et al., 2003; Rodas y Bressani, 2009).

Proteínas de la semilla de amaranto

La clasificación de las proteínas se realiza con base a sus características estructurales y funcionales; una de ellas es la clasificación de Osborne (1924) la cual se basa en la solubilidad de las proteínas.

- a) **Albúminas**, fracción extraíble con agua.
- b) **Globulinas**, fracción extraíble con soluciones salinas diluidas.
- c) **Prolaminas**, fracción extraíble con soluciones alcohólicas.
- d) **Glutelinas**, fracción extraíble con soluciones ácidas o alcalinas.

La semilla de amaranto está constituida por las fracciones: albúminas, globulinas y glutelinas siendo insignificantes las prolaminas (Montoya-Rodríguez et al., 2015).

Las fracciones proteicas de la semilla de *A. hypochondriacus* poseen un alto contenido en a.a esenciales, destacando los aminoácidos aromáticos (19%) con alto contenido en lisina (4.9 a 6.1g lys/100g de proteína), aspecto relevante ya que en otros cereales este se encuentra en cantidades limitantes o no lo presentan. También contiene triptófano, lisina, ácido aspártico, glicina, ácido glutámico, metionina, cisteína, treonina, isoleucina, valina, entre otros (Mendoza Figueroa et al., 2018). Estos aminoácidos son clave para las diferentes bioactividades descritas para *A. hypochondryacus*.

Hidrólisis enzimática

Para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas, se pueden utilizar diferentes métodos que van desde los químicos a través de ácidos hasta los enzimáticos, los cuales son los más utilizados en la actualidad. En la hidrólisis enzimática, se controlan las condiciones de la reacción como el pH, temperatura y tiempo, de las cuales depende el grado de hidrolisis e incluso el tipo de enzima o combinaciones de estas, así como la concentración, determinan la bio funcionalidad de los péptidos formados. (Benitez et al., 2008)

Las enzimas proteolíticas grado alimenticio, se han clasificado con base a su acción o sitio catalítico:

- 1) Endoproteasas: hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína (Benítez et al., 2008).
- 2) Exoproteasas: hidrolizan a.a terminales de las proteínas o péptidos (Torruco-Uco y et al., 2008; Rodríguez da Silva, 2018).

El tipo de sitio catalítico que presentan las enzimas esta dado en función del tipo de aminoácidos y ligandos que lo conforman. Por tanto, las serinproteasas o cisteinproteasas o aspartatoproteasas se caracterizan por su contenido en aminoácidos o cationes metálicos y tiene actividad endo; en las metaloproteasas la actividad se debe a un catión metálico, presentan actividad exo (Adler-Nissen, 1993)

Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) es utilizado para reportar el resultado del proceso de hidrólisis de las proteínas. Determina la porción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces (Guadix et al., 2000).

$$GH=(h/htot)100\%$$

Donde

H= número de enlaces peptídicos hidrolizados

htot = número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa.

El GH se obtiene a partir de la determinación de grupos α -amino libres, nitrógeno soluble y valoración del protón liberado después de la ruptura de un enlace peptídico a valores de pH determinados (Guadix et al., 2000).

Distribución de peso molecular

La caracterización de los péptidos bioactivos es relevante, ya que se pueden hacer inferencias o relaciones con las actividades presentes en estos; por ejemplo, para poder establecer la relación entre el tamaño de los péptidos y las actividades presentes, para mostrar

diferencias al utilizar diferentes tratamientos enzimáticos (enzima o enzimas utilizadas, tiempo de reacción, concentración entre otras) para lo cual pueden utilizar diferentes técnicas como: cromatografía de exclusión, cromatografía líquida de exclusión, cromatografía de fase reversa, sin embargo la electroforesis en gel SDS-PAGE es la más utilizada para la caracterización de proteínas e hidrolizados (Kaplan, 2000).

Actividades biológicas

Inhibidores de ECA

Los péptidos inhibitorios de ECA son los más comunes en los estudios de proteínas alimentarias. Los primeros inhibidores exógenos de ECA con un efecto *in vivo* antihipertensivo fueron descubiertos en veneno de serpiente, posteriormente se encontraron varios inhibidores en hidrolizados enzimáticos de proteína presentes en alimentos, como caseína, suero, gelatina, levadura y maíz. (Philanto y Korhonen, 2003). Sin bien la especificidad de los péptidos con el sitio activo aún no está definida en su totalidad, si se sabe que la secuencia tri-peptídica C terminal es clave además de que esta actividad depende más de los aminoácidos hidrofóbicos (Trp, Tyr, Phe o Pro) encriptados en las proteínas nativas, se tienen reportes para una mayor afinidad a sustratos o inhibidores competitivos justamente con a.a hidrófobos o con una lisina o arginina con carga positiva en el grupo α -amino (Meisel, 2001) de hecho el péptido análogo a los fármacos está integrado por la secuencia Phe-Ala-Pro, obtenido a partir del veneno de *Bothrops jararaca* (Bryan, 2009). Al respecto, Yamamoto et al. (2003) también menciona que péptidos cortos o con presencia de prolina ya sea en posición C o N terminal muestran mayor afinidad por el sitio activo de la ECA. Se han reportado otras secuencias como: Met-Arg-Trp-Arg-Asp, Met-Arg-Trp, Leu-Arg-Ile-Pro-Val-Ala e Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly (Yang et al. (2003).

Péptidos antioxidantes

La generación de radicales libres durante el metabolismo, así como las especies reactivas de oxígeno pueden provocar la oxidación de componentes celulares lo cual conlleva a la generación de enfermedades crónico-degenerativas y envejecimiento. Si bien, nuestro cuerpo tiene un sistema de defensa a través de la generación de antioxidantes, cuando se da un desequilibrio debido a una producción excesiva de antioxidantes se genera el llamado estrés oxidativo. Así, para contrarrestar el estrés oxidativo destacan los antioxidantes de tipo exógeno como los péptidos antioxidantes.

Estos péptidos tienen como mecanismo unirse a los radicales libres, lo cual evita que estos se unan a moléculas relevantes para el correcto funcionamiento celular.

En el amaranto, se han reportado péptidos con actividad antioxidante como el realizado por Soriano-Santos y Escalona-Buendía (2015), trabajaron con la especie *hypochondryacus*, utilizando la alcalasa para obtener un hidrolizado de albúmina con un 59.3 ± 1.4 % de actividad reductora del radical DPPH, para el radical ABTS un 60.3 ± 1.2 %, en la fracción de Globulinas reportan el 63.2 ± 0.6 % para el radical DPPH y 69.2 ± 1.3 para el radical ABTS.

Péptidos quelantes de metales

Los metales son importantes para una gran variedad de reacciones bioquímicas en el organismo. Por mencionar un ejemplo, participan como cofactores enzimáticos durante los procesos metabólicos. No obstante, tanto el hierro como el cobre son capaces de producir especies reactivas de oxígeno, como el hierro durante la reacción de Fenton, ocasionando un aumento de radicales libres y por tanto un estrés oxidativo las cuales derivan en daño biomolecular y por tanto celular.

Por lo cual, en los últimos años se han realizado investigaciones en la obtención de péptidos quelantes a partir de diversas fuentes. Estos péptidos se caracterizan por la presencia

de ciertos aminoácidos que se sabe tiene una mayor habilidad para formar quelatos estables. La histidina se reconoce como un aminoácido presente en hidrolizados quelantes, el anillo de imidazol de este residuo está directamente implicado en la unión al ion de cobre. Existen otros aminoácidos los cuales favorecen la unión al cobre, como glutamina, cisteína y metionina.

Es importante señalar, que no existe reportes sobre la actividad quelante para la especie *Amaranthus hypocondriacus*, la cual es motivo de investigación de esta tesis.

Péptidos antitrombóticos

El endotelio presenta una serie de reacciones bioquímicas que permite mantener el equilibrio entre los mecanismos anticoagulantes y procoagulantes. Todas las proteínas y componentes celulares involucrados en la coagulación sanguínea existen bajo condiciones fisiológicas normales en forma inactiva el endotelio intacto es antitrombótico, debido a la participación de vasodilatadores e inhibidores de la función de las plaquetas, entre estas moléculas encontramos a la prostaciclina y el óxido nítrico. Sin embargo, cuando existe una alteración en los endotelios se desencadena una serie de reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos, así para los fines de este trabajo de investigación mencionaremos el proceso de agregación de plaquetas, el cual esta mediada por la unión de fibrinógeno a su receptor (GPIIb/IIIa) de la membrana de las plaquetas, a través de la secuencia Arg-Gly-aAsp. Por tanto, es probable que los péptidos con esta secuencia puedan inhibir la agravación de plaquetas. La unidad catiónica de la cárdena lateral de la Arg y la estructura del ácido carboxílico de la Asp son clave para la inhibición.

Ahora bien, referente a los estudios sobre péptidos antitrombóticos y estabilidad los estudios son escasos (poner algunas citas). Existe una investigación realizada por Sabbione et al., (2016) en una especie del amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) en la cual generan hidrolizados antitrombóticos con pesos moleculares que van de desde los 26KDa hasta por debajo de los 14KD, a través de la activación de una proteasa aspártica endógena por un tiempo de hidrólisis de 16 h con un $IC_{50} = 5.9 \pm 0,1 \text{mg/prot/mL}$. Además, evalúan la estabilidad de una simulación gastrointestinal con resultados positivos.

Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que además de aportar nutrientes, tienen la característica de aportar un beneficio a la salud y reducir el riesgo de sufrir enfermedades. Los compuestos funcionales de los alimentos pueden dividirse en las siguientes categorías: proteínas, carbohidratos, lípidos, fenoles, flavonoides entre otros. Así la presencia de proteínas en los sistemas alimentarios, funcionan como compuestos activos que ejercen actividades fisiológicas; y este tipo de alimentos son cada vez más reconocidos. Muchas de las proteínas se encuentran en materiales alimenticios crudos muestran su acción indirecta o directamente sobre la hidrólisis de enzimas *o in vivo* o *in vitro*. En estudios recientes, se ha demostrado que las proteínas actúan como una fuente rica de péptidos biológicamente activos. El término "péptidos bioactivos" se puede explicar cómo la parte de la proteína que tiene un efecto beneficioso sobre las funciones metabólicas del cuerpo o las condiciones que en última instancia influyen en la salud. Muchos péptidos que provienen de una fuente de proteína vegetal o animal muestran sus funciones reguladoras en los seres humanos más allá de una nutrición normal y satisfactoria. Las proteínas pueden tener varios papeles en los alimentos. El propósito principal de la proteína disponible es proporcionar y / o estabilizar la estructura característica de los alimentos individuales. Por ejemplo, en un trozo de carne, la estructura del músculo se debe a la fina disposición de los tejidos conectivos y la miofibrilla. Aparte de esto, en el contexto de los alimentos, esta estructura también determina la textura de la carne cocida.

Los desarrollos tecnológicos en este campo han sido espectaculares y estos productos, que está irrumpiendo con fuerza en los mercados internacionales, serán probablemente la herramienta más importante de la ciencia de la nutrición en el futuro.

Justificación

Actualmente, en el diseño de alimentos funcionales se debe considerar no solo la adición de compuestos con actividad biológica (biofuncionalidad), que ejerzan un efecto positivo a la salud humana, además de su valor nutritivo intrínseco. También, se debe asegurar que el compuesto bioactivo, obtenido de una fuente natural, sea estable bajo las

condiciones de procesamiento para la elaboración del alimento, así como asegurar su efectividad bajo las condiciones de uso doméstico por el consumidor. Ya que, los procesos tecnológicos utilizados en la elaboración de alimentos pueden afectar las propiedades de los péptidos biofuncionales, puesto que, durante el procesamiento de los alimentos, se debe considerar sus interacciones con la estructura molecular de la matriz alimentaria, presencia de otros componentes, las condiciones del proceso como la temperatura, pH, presión, entre otros factores. En este sentido, los estudios de estabilidad de la biofuncionalidad de los alimentos ante diversas condiciones de procesamiento son todavía escasos y se requiere la realización de estas pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*. En los últimos años, el estudio de la biofuncionalidad de los péptidos que contienen los hidrolizados proteínicos de diversas fuentes, se ha incrementado por la diversidad de funciones que ofrecen: opioides, antioxidantes, inmunomoduladores, inhibidores de la enzima angiotensina (ECA), antimicrobianos etc. Estudios realizados en el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) han descrito el papel fisiológico de sus hidrolizados proteínicos sobre la actividad inhibitoria de la ECA (Tovar et al., 2009; Soriano-Santos y Escalona-Buendía, 2015), actividad antioxidante, actividad quelante y actividad antitrombótica. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la estabilidad de hidrolizados de las proteínas de almacenamiento del grano de *A. hypochondriacus* con bioactividad, bajo diversas condiciones de procesamiento; así como el efecto de una simulación gastrointestinal sobre su biofuncionalidad; debido a que *A. hypochondriacus* posee péptidos bioactivos potenciales para el desarrollo de alimentos funcionales, sin embargo, como mencionamos anteriormente es necesario conocer la estabilidad de estos péptidos bajo las condiciones de proceso de alimentos, considerando que se trata de una mezcla de péptidos y no de solo un solo péptido purificado, que se aplica como un ingrediente en alimentos funcionales fisiológicos.

Hipótesis

Los hidrolizados del grano de amaranto (*A. hypochondriacus*) con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (AIECA), antitrombótica (AAT), quelante (AQ) y antioxidante (AAO) de hidrolizados de proteínas seleccionados mantendrán su actividad bajo diferentes tratamientos de temperatura (T), tiempo (t) y pH así como después de una digestión *in vitro*.

Objetivos

Objetivos generales

Evaluar los efectos de los tratamientos de temperatura (T), tiempo (t) y pH así como una digestión *in vitro* sobre la estabilidad de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I (AIECA) antitrombótica (ATA), quelante (AQ) y antioxidante (AAO) de hidrolizados de proteínas seleccionados de amaranto para su uso como ingredientes funcionales.

Objetivos particulares

- Obtener hidrolizados de la semilla de *A. hypochondriacus* con actividades biológicas inhibitorias de la ECA, antitrombóticas, antioxidantes y quelantes.
- Evaluarla la presencia de inhibidores de serinproteasas en las fracciones A1 y G del grano de *A. hypochondriacus*.
- Evaluar la AIECA, AAT, AAO, AQF y AQC en las fracciones de AI y G y/o sus fracciones hidrolizadas.
- Evaluar el efecto de la temperatura y el pH sobre hidrolizados que presentaron la mayor actividad de inhibición de la ECA-I, antitrombótica, antioxidante, así como quelante de Cu^{2+} y Fe^{2+} para el diseño de alimentos funcionales
- Evaluar el efecto de una simulación gástrica sobre la actividad biológica de los hidrolizado de *A. hypochondriacus* para determinar su potencial en el diseño de alimentos funcionales

Materiales y métodos

Molienda de los granos de amaranto

Los granos *Amaranthus hypochondriacus* L. fueron sometidos a una molienda previa utilizando un molino, la harina obtenida se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 0.250 mm (No. 60) e inmediatamente se procedió a desengrasar la misma.

Desengrasado de harina de amaranto

La grasa de la harina de amaranto fue extraída con acetona (5 mL/g) en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 h. (3 repeticiones), seguida de filtración al vacío y un lavado con éter. La harina fue colocada en una campana de extracción para permitir la evaporación de los solventes. Posteriormente se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 0.250 mm (No. 60) y fue almacenado a 5° C. La harina desengrasada resultante se utilizó como material de inicio para la producción de hidrolizados de proteína de amaranto.

Extracción de albúmina 1 y globulina con Na₂SO₄

La extracción se realizó siguiendo el método de Padhye y Salunke (1997). La muestra de 50 g de harina desengrasada se mezcló con 300 mL de Na₂SO₄ al 5% (0.04 M) durante 30 min. a 5° C y se centrifugó durante 20 min. a 13,000 x. La muestra se separó en sobrenadante y en residuo de harina. Al residuo se le agregó 200 mL Na₂SO₄ al 5% se mezcló durante 30 min. y centrifugó, el sobrenadante obtenido se juntó con el primer sobrenadante y precipitó con (NH₄)₂SO₄ al 50, 70 y 100% de saturación y centrifugó (20 min. a 13,000 xg) en cada nivel. El precipitado de proteína formado se dializó con agua durante 24 horas, con cuatro cambios de agua desionizada, posteriormente se centrifugó (20 min. a 13,000 xg). El sobrenadante es la fracción que contenía la proteína soluble en agua (albúmina 1). Después el residuo fue dializado con Na₂SO₄ al 10% durante 24 h. y se centrifugó, el sobrenadante el cual contenía la proteína soluble en soluciones salinas (globulina).

El contenido de proteína fue determinado por el método de Bradford (1976), para lo cual se elaboró una curva patrón de albúmina bovina.

Hidrólisis enzimática con alcalasa

La hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto se llevó a cabo utilizando el método de Surovset et al., (2001), con alcalasa, a una concentración de 2.4 UA/mL. (actividad específica de 2.4 UA/g)

Para el ensayo se añadieron 320 μL de búfer de fosfatos 0.5 M; pH 7.4, seguido de 600 μL de albúmina 1 o globulina (5 mg/mL) la mezcla se incubó durante 5 min. a 50°C. Posteriormente se añadieron 80 μL de solución de alcalasa (2.4 mUA/mL) en búfer de fosfatos 0.5 M; pH 7.4 a 50°C, obteniéndose una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.8 UA/g.

La hidrólisis se efectuó durante los siguientes tiempos: 3, 8.8, 10.3, 24 y 48 h La reacción se detuvo añadiendo 100 μL de solución de fenilmetilsilfonil (PMSF) (2 mg/ mL) en etanol.

Determinación del grado de hidrólisis mediante los grupos amino terminal

Se determinó utilizando el método de Adler-Nissen (1979) TNBS. Esta técnica mide grupos amino libres en hidrolizados proteicos y consiste en la cuantificación de los grupos amino libres (Figura 1), tiene su fundamento en la reacción de los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis con el ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS).

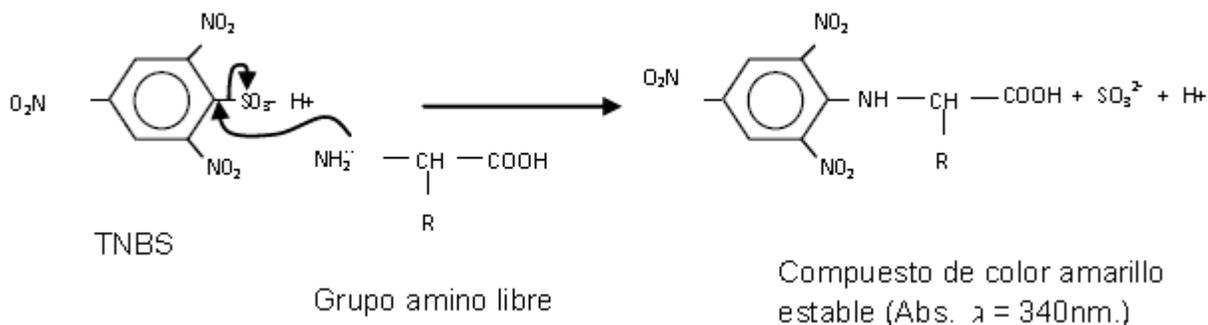


Figura 1. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis alcalina (Adler-Nissen, 1979).

- Se tomaron alícuotas de 64 μ L de cada dilución por duplicado.
- Se adicionó 1 mL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 8.2 y 0.5 mL de TNBS 0.05%, posteriormente se agitaron los tubos.
- Después se incubaron a 50°C durante 30 min.
- La reacción se detuvo adicionado 1 mL de sulfito de sodio 0.1 M.
- Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min.
- Leyó absorbancia a 420nm.

Se elaboró un curva patrón utilizando una solución de Leucina 6mM y posteriormente se hicieron disoluciones de esta para cada uno de los puntos de la curva.

Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en una curva de calibración, concentración vs. absorbancia que se realizó utilizando como patrón leucina en concentraciones de 6 mM, siguiendo el mismo procedimiento para las muestras.

Determinación de inhibición de serinproteasas

Se preparó una solución de caseína al 1% (cloruro de calcio 5mM en buffer de fosfatos pH 6.5) En tubo de ensaye se mezclaron 450 μ L de caseína y 50 μ L de extracto de fracciones de A1 o G, posteriormente se incubaron durante 15 min. a 35° C. Posteriormente se agregaron 750 μ L de TCA (ácido tricloroacético) se agitaron y centrifugaron a 15000 rpm. Por 30 min. a una temperatura de 2°C. y se leyó la absorbancia a 280nm.

Se preparó un blanco con 450 μ L de caseína, 750 μ L de TCA y 50 μ L de extracto), para calibrar a 280nm.

Evaluación de la capacidad inhibitoria de la ECA

La actividad de la ECA se determinó de acuerdo con el método de Hayakari et al. (1978) con modificaciones. Este método se fundamenta en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con ácido cianúrico TT (2,4,6-tricloro-s-triazina) formando un compuesto

cromóforo el cual puede ser leído en el espectro a una longitud de onda de 382 nm (figura 2).

El ensayo consistió en mezclar en un tubo de ensaye 150 μ L de búfer de incubación (ácido bórico 0.2 M-NaCl 2 M) pH 8.3; seguido de 100 μ L de NaCl (300 μ M), se añadieron 50 μ L de (ECA) a una concentración de 165 mU, esta mezcla se incuba a 37°C durante 5 min.

Posteriormente se agregó 50 μ L de búfer de fosfatos 40 μ M; pH 8.3, más 50 μ L de muestra hidrolizada de albúmina 1 o globulina (previamente centrifugada a 10;000 \times g durante 10 min.) la cual se encuentra a 37°C, seguido de 100 μ L de HHL (Hipuril-L-histidil-L-leucina) 0.2 M que también se encuentra a 37°C, posteriormente esta mezcla se incubó a 37°C durante 1 h. La reacción fue detenida colocando los tubos en agua en ebullición durante 10 min.

Después, se adicionó 1 mL de búfer de fosfatos 0.2 M; pH 8.3 y 1.5 mL de solución de TT (2,4,6-tricloro-s-triazina) al 3% en dioxano, seguido por agitación en vortex hasta que la solución se mostró transparente y por último se realizó la medición de la absorbancia a 382 nm. Se utilizó un blanco al cual se le añadieron todos los reactivos excepto la muestra hidrolizada, la cual se substituyó por búfer de fosfatos 40 μ M; pH 8.3.

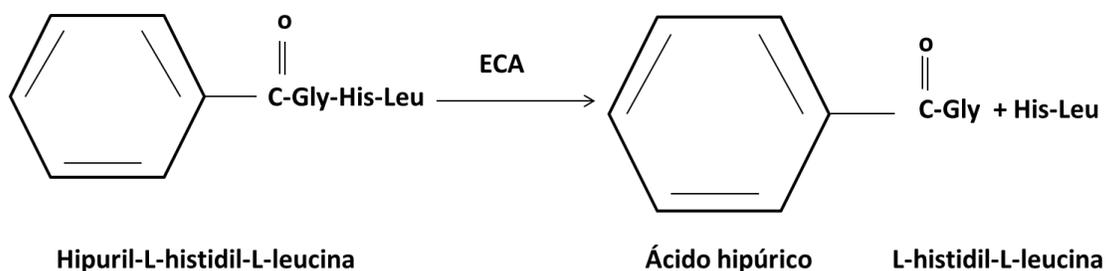


Figura 2. Reacción de la ECA con HHL formando ácido hipúrico.

Capacidad de reducción del radical DPPH

La capacidad de reducción del DPPH fue evaluada según Brand-Williams (1995). Se mezclaron 300 μl de solución de DPPH en metanol (0.5 mM) con 500 μl de la muestra. Se adicionaron 3.0 ml de metanol. Se leyó a 517 después de 45 minutos. El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición} = (AC(0) - AA(T)) / AC(0) \times 100$$

AC(O)=Absorbencia del control negativo en el momento de preparación de la solución.

AA(t) = Absorbencia de la muestra después de 45 min.

Capacidad de reducción del radical ABTS

La capacidad de reducción del radical ABTS por las muestras se evaluó según Re-Pellegrin (1988), con algunos cambios al método de Miller et al. (1993). El ABTS+es generado por su oxidación a causa de la exposición con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) obteniéndose e radical catiónico ABTS^{\pm} o el dicatión ABT^{2+} , el cual tiene un color verde azul intenso.

Se mezcló una solución 7 mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio en agua, se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas hasta obtener una solución azul oscuro intenso. Se diluyó en agua teniendo un volumen total de 3 mL, hasta alcanzar una absorbencia de 0.7 leído a 734 nm. Esta solución se mezcló con 10 μL de la muestra. La absorbencia se monitoreo cada minuto, por un tiempo total de 6 min. a 30°C.

Actividad quelante de Cu^{2+}

La actividad quelante de Cu^{2+} se evaluó con trimetil-murexida (TMM) que es un agente quelante. El análisis quelante de Cu^{2+} se realizó con 1 mL de la disolución de la muestra, a la cual se le adicionó 1 ml de buffer de hexamina 20 mM que contenía 20 mM

KCl y 3mM CuSO₄, después se adicionaron 0.25 ml de 1 mM de tetrametil murexida (TMM). Se midió la absorbencia a 485 y 530 nm.

Actividad quelante de Fe²⁺

La evaluación de la actividad quelante que presentaron las muestras se llevó a cabo según Xie (2008). El Fe²⁺ forma un complejo con tres moléculas de ferrozina de color púrpura que presenta absorbencia máxima a 562nm. En presencia de compuestos antioxidantes el Fe²⁺ puede quelarse y la intensidad de color purpura del complejo con ferrozina es menor, ya que es proporcional a la concentración del antioxidante de la muestra de interés.

Se mezcló 1 mL de muestra con 50 µL de dicloruro de hierro 2mM y 1.85 mL de agua desionizada. Se dejó reposar por 3 min. y se adicionaron 100 µL de ferrozina 5 mM mezclando vigorosamente. Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbencia a 562 nm.

Determinación de la actividad antitrombotica

Se determino como la inhibición de ageregación plaquetaria, de acuerdo con el método de González et al. (2010) con ciertas modificaciones. Se extrajo sangre de donantes sanos (venopunción) empleando 0.129 mmol/l de citrato trisódico, las muestra se tomó del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Las muestras se centrifugaron a 1400g durante 4.5 min. a 20-24° C, se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP). El PPP se obtuvo al centrifugar nuevamente a 4009 g durante 15 min. los ensayos se realizaron en un lumiagregómetro de dos canales (Modelo 560 CA y software adjunto, Modelo 810 AGGRO/LINK Chrono-log Havertown, PA, EE. UU). Posteriormente se añadieron 50 µL de Alb1h24 y GloH24 disueto en dimetilsulfóxido (DMSO). La agregación plaquetaria se indujo con 5 µM de ADP y la respuesta se registró durante 3 min. se estimó en unidades arbitrarias. La absorbencia de luz se corrigio con PPP y DMSO. Las condiciones de control fueron plaquetas inducidas con ADP 5 µM y la ageregación de control promedio se tomó como el 100%.

Determinación del IC₅₀

Para todas las pruebas de bioactividad se calculó el IC₅₀, ya que su valor indica la concentración necesaria del péptido o el hidrolizado para lograr una inhibición en un 50% de las actividades.

Condiciones de tratamientos

Para investigar el efecto de la temperatura, las muestras de las soluciones de los hidrolizados se ajustaron a pH 7 y pH 4, se calentaron a 40, 60, 80, 100 y 120 ° C durante 1 h. Para evaluar el efecto del pH, las soluciones de péptidos se incubaron a 100 ° C a valores de pH de 2.0, 3 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 12.0 durante 1 h. En el caso del efecto del tiempo de tratamiento se evaluó a una temperatura de 100°C, a pH 7 y pH 4 durante 1,0, 2,0, 3,0, y 4,0 h.

Estabilidad frente a proteasas gástricas *in vitro*

Se evaluó por tratamiento de una solución del péptido al 1% (w/v) en buffer 0,1 M KCl-HCl (pH 2,0), con pepsina (Sigma Chemical Co.) se incubó a 37 ° C durante 4 h, la reacción se detuvo por ebullición en un baño de agua durante 15 min y se neutralizó a pH 7,0 con la adición de NaOH₂ N de esta solución se tomó 1 ml y se centrifugó (10000g, 40 min) y el sobrenadante se utiliza para la determinación de la actividad inhibitoria de la ECA. La solución neutralizada restante se digirió adicionalmente por 2% (w/w) de pancreatina a 37 ° C durante 4 h. La enzima fue inactivada por ebullición durante 15 min seguido por centrifugación (10000g, 40 min) y el sobrenadante utilizado para la determinación de las actividades biológicas.

Análisis estadístico

Los datos se presentarán como media ± desviación estándar (n=3). Las diferencias significativas entre los tratamientos se determinarán con un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (p<0-05).

Resultados

Grado de hidrólisis

Para realizar la hidrólisis se utilizó alcalasa, la cual es una endoproteasa de tipo serín proteasa. Se eligió esta enzima debido a su mostrada eficacia para la obtención de biopéptidos en comparación con otras proteasas (Ayala-Niño et al., 2020). También se eligió debido a que libera mayormente aminoácidos de tipo hidrofóbicos, esto es importante ya que, como veremos más adelante este tipo de aminoácidos permiten interacciones que derivan en diferentes actividades biológicas, como las presentes en *A. hypochondriacus*

En el amaranto, las albúminas y globulinas representan entre el 60 % y 70 % del nitrógeno proteínico total, siendo para algunos investigadores la albúmina la fracción de reserva proteica más abundante para otros lo es la globulina (Cóndes y Añon, 2009; Sabione et al., 2015), en menor proporción están presentes las glutelinas. A partir de la extracción de estas tres fracciones se determinó el grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis se presenta en la tabla 1. Las fracciones de albúmina 1 (A1 y globulina (G) mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tiempos de hidrólisis alcanzando un grado de hidrólisis máximo de 42.1 ± 0.4 % para A1 y de 23.01 ± 1.3 % para G; en el tiempo de 10.3 h, no hubo diferencias significativas en ambas fracciones. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios como los realizados por Tovar et al. (2009), Paredes-Ruíz (2013) y Becerril Rodríguez (2017).

Tabla 1. Grado de hidrólisis de las proteínas de almacenamiento del grano de *A. hypochondriacus* L. utilizando alcalasa.

	A1	G
	GH	
t (h)		
3	10.33±0.04 ^a	7.5±1.0 ^a
8.8	19.43±0.01 ^b	16.3±1.7 ^b
10.3	42.1±0.4 ^c	23.01±1.3 ^c
24	43.00±0.3 ^c	22.34±0.89 ^c
48	43.6 ±0.89 ^c	23.56±1.6 ^c

*Valores de la media ±desviación estándar (n=3).

Diferente letra en una columna indica diferencia estadística (P<0.05).

La fracción de G mostró una mayor resistencia a la hidrólisis posiblemente a la alta polimerización (Castellani et al., 2000) lo cual dificulta a las proteasas alcanzar los sitios de escisión específicos. Trabajos previos han reportado una mayor resistencia de G a la hidrólisis como los realizados por Condes et al. (2009) y Tovar et al. (2009).

Bajo las condiciones de hidrólisis ensayadas para A1 y G se obtuvieron hidrolizados extensivos, es decir con GH superior al 10% (Vioque et al., 2001).

Un aspecto relevante de señalar son los tiempos prolongados de hidrólisis, contrario a lo reportado en otros estudios: Sabbione et al. (2015) reportan un GH de 15.7±0.5 para la fracción de albúminas y de 14.2±0.5 para las globulinas, en un tiempo de hidrólisis de tan solo 40 min. en contraste con el tiempo de 3 h de hidrolisis donde se alcanzaron GH inferiores a estos; Condes et al. (2009) obtienen un GH de 7.28±0.15 % después de 1h de tratamiento con tripsina; Orsini et al. (2011) con GH de 36.9% en proteínas de granos de semilla de A.

mantegazzianus después de un tiempo de 120 min de hidrólisis; Tironi y Añon (2010) con GH de 19 % para la fracción de albúmina, 20.9 % para G con alcalasa durante una 1h. a partir de los resultados podemos inferir que en el grano de amaranto existe la presencia de inhibidores de serinproteasas.

Por lo tanto, se realizaron pruebas de inhibición de serinproteasas con las fracciones de *A. hypochondriacus*.

Inhibición de serin proteasas

Debido a lo mencionado anteriormente se realizaron pruebas para evaluar la actividad inhibitoria de serin proteasas presentes en las fracciones e hidrolizados del grano de amaranto. Si bien todas las serin proteasas actúan en el mismo sitio catalítico, la afinidad por el sustrato es diferente. La tripsina rompe enlaces péptidicos por el lado del grupo carboxilo con cadenas laterales y con carga positiva; en cambio la quimiotripsina lo hace por el lado carboxilo de aminoácidos aromáticos (Whitaker, 2000).

Se probaron tres serin proteasas: alcalasa, ya que es la enzima utilizada para la generación de los hidrolizados; además tripsina y quimotripsina, debido a que son las principales proteasas digestivas. En la figura 3 se muestra que A1 y G, inhiben enzimas del grupo de las serin proteasas: alcalasa, tripsina y quimotripsina. En su forma nativa inhiben el 50% de la actividad de las serin proteasas. La G tiene mayor actividad inhibitoria de serin proteasas comparada con A1. Este mismo comportamiento puede observarse en los trabajos reportados por Condés et al. (2009) y Tovar et al. (2009). La serin proteasa con menor inhibición fue la alcalasa en ambas fracciones: A1 con un IC_{50} de 21.51 ± 0.54 y de 6.73 ± 0.71 mg/mL para G. Por esta razón el tiempo de hidrólisis para obtener el mayor GH tanto para A1 y G es prolongado.

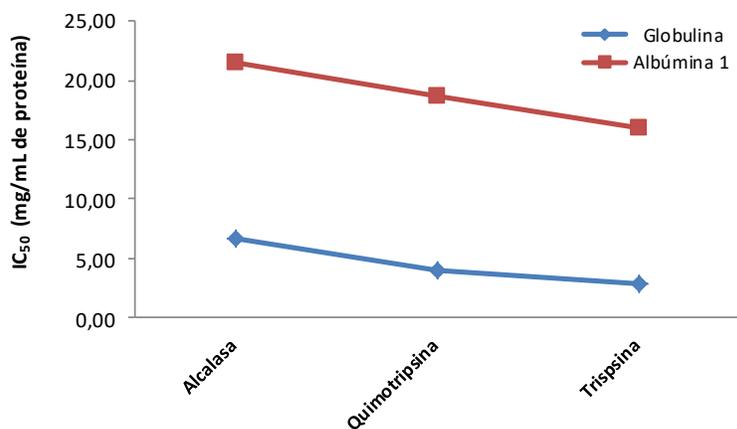


Figura 3. Valores IC_{50} de la actividad inhibitoria de serin proteasas de las fracciones proteicas (A1 y G) de almacenamiento de *A. hypochondriacus*.

Ademas, se realizó una corrida electroforetica (SDS-PAGE) previa, de las fracciones porteicas de A1 y G, para analizar la composición polipeptídica de las fracciones, para luego compararlos con la corrida de los extractos parcialmente purificados por cromatografía en Sephadex G-50. También se compararon con otros estudios, ya que diferentes especies de amaranto se han estudiado empleando diversos tipos de caracterizaciones para estudiarlas comparativamente, destacado el contenido proteico total, la composición aminoacídica, así como los perfiles electroforéticos. especies del género *Amaranthus* (*A. tricolor*, *A. mantegazzianus*, *A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus*, *A. paniculatus*), al pertenecer al mismo género poseen similitud en su composición química, como las proteínas con pequeñas diferencias entre ellas (Eloho et al., 2013; Sabbione, 2015), lo cual explica las variedades en cuanto a las bioactividades que presentan.

En la figura 4, se muestran los perfiles de A1 y G obtenidos por electroforesis utilizando el método de extracción con Na_2SO_4 0.04 M. En el perfil electroforetico se observa para la fracción de A1 bandas que corresponden a pesos moleculares superiores a los 120 KDa y por

debajo de 19KDa. Estos datos corresponden con los realizados por otros autores como Gorinstein (citado por Villanueva y Arnao, 2007) reporta para cuatro especies de amaranto, pesos moleculares entre los 30 y 37 kDa. Como se observa las subunidades correspondientes a pesos moleculares entre 32 y 37 KDa corresponden a las bandas de polipeptidos que se observan mas intensas en el perfil realizado, estos datos son acordes a los realizados por Raina y Datta (1992), quienes reportan una proteína de 35 kDa perteneciente a la fracción de albúmina de *A. hypochondriacus*. Asimismo, Medrano y Ortega (1994), refieren para la fracción de albúmina en cuatro ecotipos pero de la especie *A. caudatus*, 19 bandas de polipéptidos, con pesos moleculares entre 80 y 10 kDa, siendo más abundante la banda correspondiente a los 32 kDa. Las globulinas constituyen la principal fracción proteica presente en aislados de amaranto, dentro de esta se encuentra la globulina 11S (amarantina) como principal constituyente. En el perfil electroforético se encuentra una banda con un peso molecular de aproximadamente 36 KDa, probablemente se trata de la amarantina, la cual ya ha sido secuenciada (Konishi et al., 1985). También se pueden observar numerosas bandas características de los polipéptidos que constituyen a la fracción de globulina, sin embargo el número de bandas dependerá del método de extracción y de factores inherentes de la planta

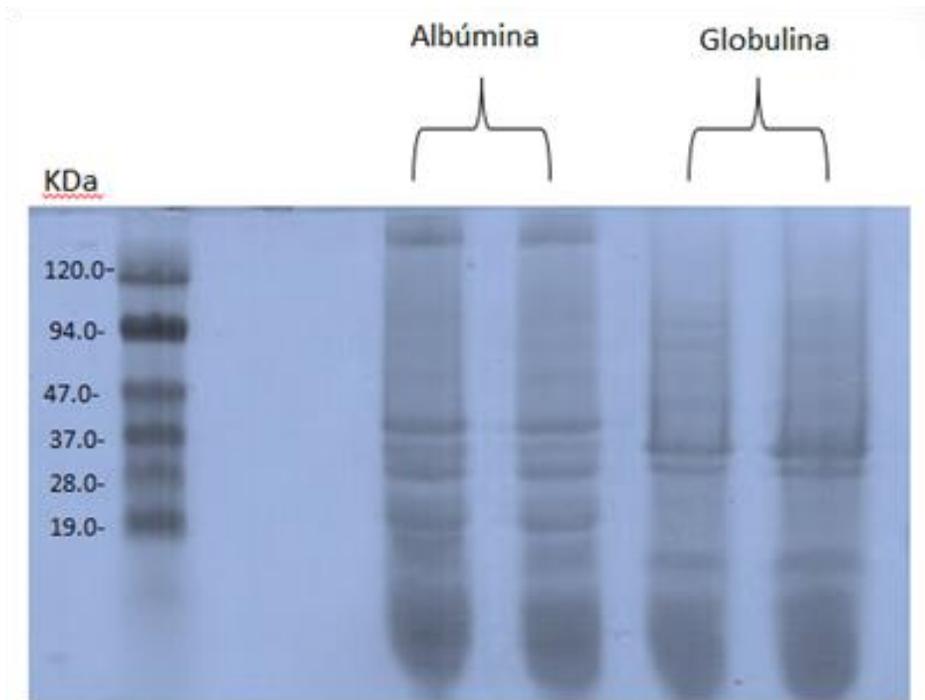


Figura 4. Perfil electroforetico en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de A1 y G de *A. hypochondriacus*.

Posteriormente, se realizó una purificación parcial de las fracciones de A1 y G por cromatografía en gel Sephadex G-50 (figura 5). Se detectaron tres picos para la fracción de A1 con pesos moleculares aproximadamente de 37 kDa (figura 6). La fracción de 37 kDa, se ha aislado de otras especies de *amaranthus*, en estos trabajos se menciona que en esta fracción se encuentra una gran variedad de polipéptidos con diversidad en sus aminoácidos. Las tres fracciones de A1 presentaron actividad inhibitoria de serin proteasas. La fracción III de A1 presentó la mayor inhibición para la tripsina, quimotripsina y alcalasa. Esto sugiere que conforme se obtienen polipetidos más pequeños aumenta la capacidad inhibitoria ya que el IC_{50} disminuye.

En cuanto a G también se detectaron tres picos con pesos moleculares menores a 19 kDa (figura 5 y 7). La fracción II (G) de globulina presentó la mayor inhibición para la tripsina quimotripsina. Sin embargo, para la alcalasa se obtuvo en la fracción I. Como se mencionó anteriormente la tripsina fue la proteasa con mayor resistencia a la inhibición por

parte de A1 ($IC_{50}=16.01\pm 0.3$ mg/mL) y G ($IC_{50}=2.87\pm 0.56$ mg/mL). Valdes-Rodriguez et al. (1993) purificaron un inhibidor de serin proteasas (ATI) de la semilla de *A. hypochondriacus* con un peso molecular de 7.4 kDa el cual actúa sobre quimiotripsina y tripsina. Por su parte, Hejgaard et al. (1994) también purificaron un inhibidor de serin proteasas (ATSI) de *A. caudatus* con un peso molecular de 7.8 kDa rico en valina, arginina y ácido glutámico carente de metionina. En este estudio el inhibidor de serin proteasas inhibe de la siguiente manera: tripsina > quimiotripsina > alcalasa. Sin embargo, aunque ATSI es muy estable a temperaturas altas esta se puede inactivar con pepsina a pH 2. En otros reportes se ha encontrado el mismo patrón (Wang et al., 2013; Wang et al., 2014). Esto puede ser debido a que las subtisilinas tienen los mismos tres residuos catalíticos que otras serin-proteinasas Asp³², His⁶⁴ y Ser²²¹, pero en diferente posición. Lo anterior indica que, para acortar el tiempo de hidrólisis, si se desea utilizar una serin proteasa, debe haber un tratamiento proteolítico previo con una enzima como la pepsina y posteriormente la hidrólisis con la serin proteasa.

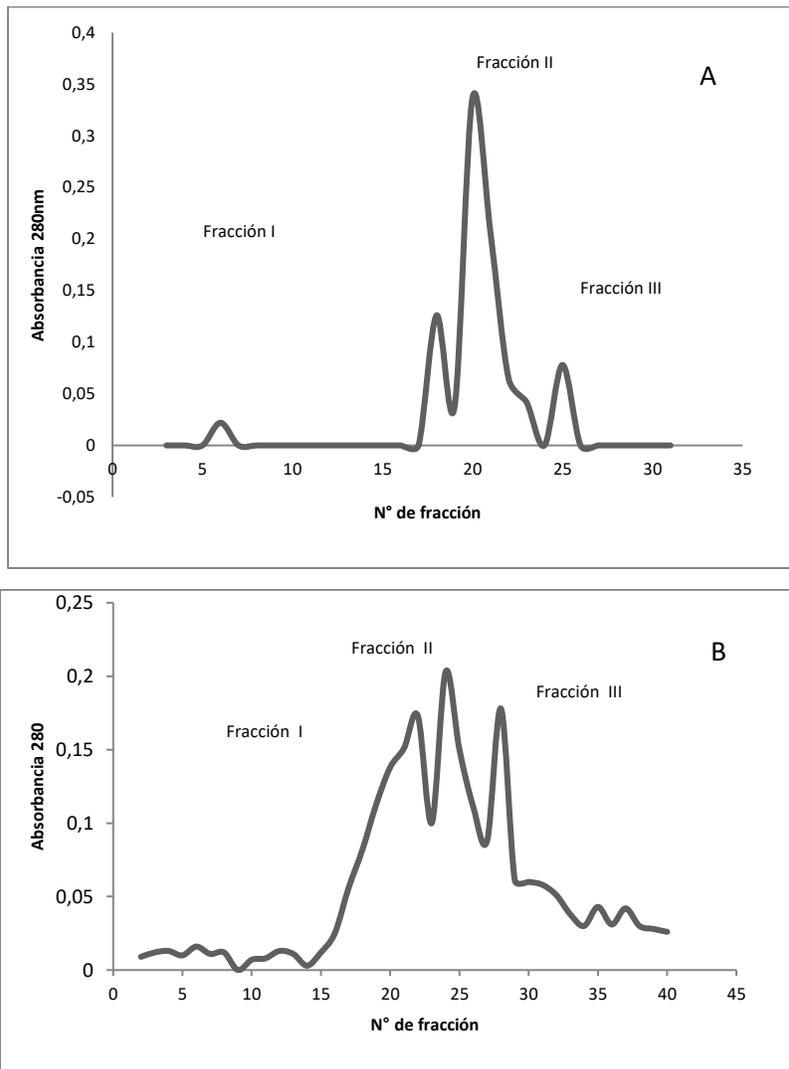


Figura 5. Cromatografía por filtración en Sephadex C-50 de alb1(A) y de G (B) de *Amaranthus hypochondriacus*

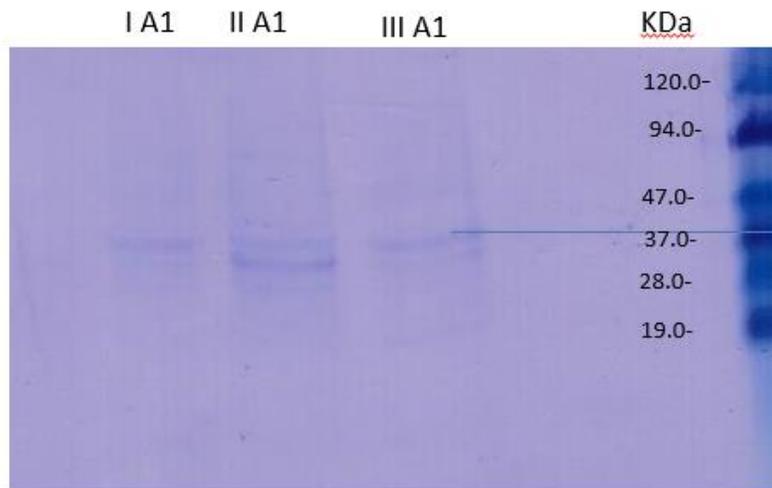


Figura 6. Perfil electroforético SDS-PAGE de fracciones de A1 de *A. hypochondriacus* obtenidas por filtración en gel.

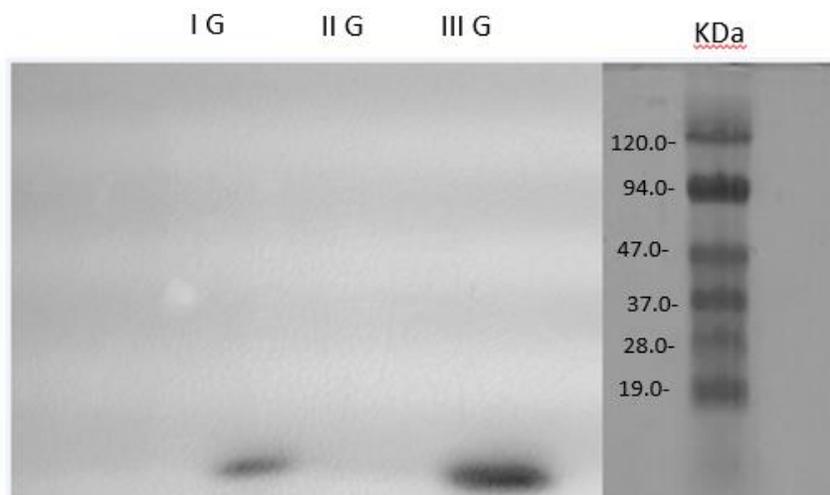


Figura 7. Perfil electroforético SDS-PAGE de fracciones de G de *A. hypochondriacus* obtenidas por filtración en gel.

Actividad inhibitoria de la ECA

En la actualidad los péptidos o polipéptidos con actividad inhibitoria de la ECA, son los más estudiados, hasta el 2011 se tenía un registro de 556 secuencias de péptidos con esta actividad (Nardo, 2017). Sin embargo, es importante no solo evaluar la actividad, ya que el objetivo en el área de la biotecnología de alimentos es el desarrollo de alimentos funcionales, para lo cual es fundamental evaluar la estabilidad de la bioactividad de los péptidos al someterse a condiciones de procesamiento de alimentos. Por lo tanto, en la primera etapa se evaluaron las actividades para determinar los hidrolizados con mejor actividad para posteriormente someterlos a las pruebas de estabilidad.

En las pruebas de actividad inhibitoria de la ECA, no se observa actividad en las proteínas nativas de A1 y G estos resultados son similares a los de Tovar-Pérez et al (2009) para hidrolizados de A1 y G de granos de *A. hypochondriacus* con alcalasa, así como los de Rui et al. (2012). En la proteína se encuentra una mezcla heterogénea de péptidos que incluye péptidos sin actividad que pueden producir un efecto antagonista, disminuyendo la actividad inhibitoria, pero al hidrolizarse las fracciones de péptidos son más homogéneas lo cual evita el efecto antagonista y por tanto la actividad biológica de los péptidos.

No obstante, existen dos estudios con reporte de actividad inhibitoria de la proteína sin hidrolizar en *A. mantegazzianus* realizado por Fritz et al. (2011) con un 10.8 % de inhibición de la ECA y el de Ayala Niño et al. (2019) en *A. hypochondriacus* con 10.58 % de actividad. Por el contrario, como mencionamos anteriormente en nuestro trabajo, se presentó actividad solo después de una hidrólisis. Además, en este estudio utilizan diferentes proteasas incluyendo la alcalasa en *A. mantegazzianus*, los porcentajes de inhibición de la ECA van de 0.2 al 76 %. Estos valores se encuentran entre los rangos reportados en otras fuentes vegetales como la soya (0.21-1.73 mg/mL; Philanto-Leppälä et al. 2000).

En la tabla 2 se muestra la actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados de A1 y G. La actividad inhibitoria de la ECA se expresó en valores de IC₅₀ (cantidad de hidrolizado necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA). Después de un tiempo de tres horas

de hidrólisis se reporta un IC_{50} de 1356 $\mu\text{g/mL}$ para A1 y de 2345 para la G, la menor concentración de hidrolizado se observó para A1 a las 10.3 h de 925 $\mu\text{g/mL}$ y para G a las 8.8 h de 1391 $\mu\text{g/mL}$, al continuar con la hidrólisis no se encuentran diferencias significativas. Razón por la cual se eligen estos hidrolizados para realizar las pruebas de estabilidad, así como las pruebas de digestión *in vitro*.

Tabla 2. Actividad Inhibitoria de la ECA

	A1	G
t (h)	AIECA ($\mu\text{g/mL}$)	
0	---	---
3	1356 \pm 0.01 ^a	2345 \pm 1.3 ^a
8.8	1451 \pm 0.09 ^b	1391 \pm 1.1 ^b
10.3	925 \pm 0.015 ^c	1403 \pm 0.6 ^c
24	932 \pm 0.02 ^c	1398 \pm 1.7 ^c

*Valores IC_{50} de la actividad inhibitoria de la ECA de las proteínas de almacenamiento del grano de amaranto y sus hidrolizados.

Por un lado, se conoce que es clave la interacción del inhibidor con un sitio de unión aniónico distinto al sitio catalítico para la inhibición de la ECA, por lo tanto, la estructura de los péptidos es importante para que este pueda interactuar con el sitio catalítico o con otro sitio diferente como en el caso de la inhibición no competitiva; debido a las diferencias de especificidad del sustrato entre los dos sitios catalíticos de la ECA, los inhibidores de la ECA pueden inhibir solo un sitio catalítico. Ahora bien, se ha demostrado que los aminoácidos lisina o arginina con una carga positiva en el grupo α - amino, aumentan la capacidad inhibitoria. En este sentido, la lisina es uno de los componentes aminoacídicos del amaranto, por lo tanto, se puede inferir que después de la hidrólisis se formaron péptidos con residuos de lisina presente en su estructura, permitiendo una interacción de la lisina con el sitio activo de la ECA.

Por otro lado, la unión de los péptidos a la ECA está determinada por la secuencia tripeptídica C-terminal, con posibilidad de interactuar con tres regiones del centro activo. Como se mencionó anteriormente los aminoácidos de tipo hidrofóbico favorecen la unión en estas zonas; esto explica porque las fracciones de A1 y G no muestran actividad, ya que en estas los a.a hidrofóbicos se encuentran al interior de la estructura proteica. Precisamente el péptido inhibitorio presente en el extracto de veneno de serpiente tiene una secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, favoreciendo su unión muy fácilmente al centro catalítico de la enzima. Yamamoto et al. (2003) mencionan que péptidos que muestran alta actividad de la ECA son péptidos relativamente cortos con un residuo de prolina en el carbono C-terminal.

Por lo tanto, es determinante la secuencia de los aminoácidos, así como el tipo en la posición C-terminal o en posición N-terminal para el tipo de actividad biológica que estos presenten.

Al realizar una comparación de los resultados de investigación con otros trabajos como el desarrollado por Ayala-Niño (2019) en el cual a través de una hidrólisis con alcalasa y flavourenzima por un tiempo de tan solo 40 min de la proteína de *A. hypochondriacus* alcanzaron una inhibición de la ECA del 58 %, a diferencia de los hidrolizados con alcalasa y flavourenzima por 2 h con un 49 y 39 % respectivamente, no alcanzando el 50 % de inhibición hidrolizando con alcalasa; en este trabajo se obtiene un porcentaje superior al 50 % a partir de las 3 h horas de hidrólisis, a partir de esto se confirma lo ya mencionado por otros autores; son diversos los factores que determinan el tipo de actividad y la capacidad presente en los péptidos obtenidos por hidrólisis, como el tipo de enzima o enzimas y el tiempo de hidrólisis; ya que se generan diferentes péptidos y por ende el tipo de actividad o la capacidad de la actividad biológica es variable.

Actividad antitrombótica AAT

La coagulación sanguínea es un proceso complejo que implica la confluencia de numerosos factores y fenómenos y consiste en tres fases superpuestas que mantienen la integridad del sistema circulatorio: la fase vascular, la fase plaquetaria y la fase coagulada. La fase plaquetaria, también llamada hemostasia primaria, implica la adhesión, activación y agregación de las plaquetas. La fase de coagulación o hemostasia secundaria implica la participación de factores de coagulación, muchos de los cuales son proteasas sintetizadas en el hígado como zimógenos que, en orden secuencial, conducen a la formación de coágulos.

En este trabajo, se observó AAT evaluando la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria desencadenada por ADP. Esta cascada de coagulación consta de dos vías desencadenantes, la intrínseca y la extrínseca, ambas convergentes en la vía común. Con el fin de evaluar el efecto de las condiciones de procesamiento sobre la estabilidad de la potencial actividad antitrombótica de Alb1H103 y GloH88.

No es posible comparar las concentraciones de fracciones peptídicas de hidrolizados de proteínas de amaranto con la actividad antitrombótica evaluada en el estudio de Sabbione et al. (2015) y los resultados aquí obtenidos porque los ensayos evaluaron diferentes factores de coagulación. A pesar de ello, Alb1H103 (431.1 ± 0.01 mg / mL) y GloH8.8 (12.8 ± 0.06 mg / mL) presentaron una actividad antiplaquetaria similar al del estrógeno Buame ($400 \mu\text{M}$) (Tabla 3). Sin embargo, a diferencia del estudio de Sabbione et al. (2015), ellos realizaron ensayos en la fracción de glutelina.

En el trabajo realizado por Ayala-Niño (2019) realizan una hidrólisis por un tiempo de 2 h de la proteína de *A. hypochondriacus* en el ensayo de inhibición de trombina con un porcentaje de 90 %.

Tabla 3. Actividad antitrombótica

<i>Hidrolizado</i>	<i>Tiempo (h)</i>	<i>DH (%)</i>	<i>Bioactividad (IC₅₀ µg/mL)</i>
<i>Alb1H</i>	10.3	42.1±0.4	AAT=431.1±0.01
<i>GloH</i>	8.8	16.3±1.7	ATA=12.8 ±0.06
<i>Buame</i>			AAT=400 µM

*Valores IC₅₀ de AAT de las proteínas de almacenamiento del grano de amaranto y sus hidrolizados.

Actividad quelante (AQ)

Diversos péptidos antioxidantes generados por hidrólisis de proteínas de alimentos constituyen una nueva fuente de componentes funcionales que pueden inhibir procesos oxidativos tanto en organismos como en alimentos. Uno de los mecanismos para el efecto antioxidante de péptidos es la quelación de metales, debido a que la transición de metales cataliza numerosas reacciones oxidativas (Gallegos-Tintoré et al., 2011).

Por lo cual, se realizó el análisis de la actividad quelante de los hidrolizados de las fracciones de A1 y G, encontrándose que los hidrolizados producidos con alcalasa de las fracciones proteicas del grano de *A. hypochondriacus* presentan actividad quelante tanto de Cu²⁺ (AQC) como de Fe²⁺ (AQF).

Como se observa en la tabla 4, el mayor porcentaje de quelación se alcanzó a las 24h de hidrólisis tanto en la fracción de A1 como de G con 67.87 y 53.45 % respectivamente. La ACQ aumentó conforme avanzaba la hidrolisis al llegar a las 48h no hay diferencias significativas. Respecto a la AQF para A1 el mayor porcentaje (78.89 %) se alcanza a las 10.3 h y en G de 70.56 % a las 24 h.

Tabla 4. Actividades quelantes de hidrolizados de Cu²⁺ y Fe²⁺

t (h)	A1		G	
	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺
3	35.8±0.95 ^a	42.78±1.5 ^a	28.62±0.75 ^a	35.89±0.65 ^a
8.8	55.67±1.4 ^b	67.89±0.46 ^b	39.76±0.59 ^b	53.89±1.4 ^b
10.3	57.09±0.78 ^b	78.89±1.8 ^c	39.92±0.63 ^b	54.89±0.35 ^b
24	67.87±0.93 ^c	80.34±0.67 ^c	53.45±1.2 ^c	70.56±0.52 ^c
48	68.24±1.9 ^c	80.7±0.83 ^c	53.70±1.9 ^c	71.07±0.33 ^c

*Valores de la media ±desviación estándar (n=3).

Diferente letra en una columna indica diferencia estadística (P<0.05).

Para todos los hidrolizados excepto GloH24 no aumento la actividad quelante, lo cual indica que, al hacer extensiva la hidrólisis, es probable la presencia de un mayor número de aminoácidos libres, los cuales no son efectivos para realizar la formación de quelatos, este tipo de efecto ya se ha reportado en otros trabajos como los realizados por Torres-Fuentes et al. (2013) los cuales reportan un aumento de la actividad quelante de Cu²⁺ después de una hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina de proteínas de garbanzo y posteriormente una disminución conforme aumenta el grado de hidrólisis. En otra investigación realizada por Zarei et al., (2016) reportan la actividad quelante de hidrolizados de proteína de almendra de palma encontrando que la actividad aumenta rápidamente después de 2 h de hidrólisis seguido de una meseta entre las 12 y 22 h.

Así una disminución de la actividad quelante al aumentar el grado de hidrólisis, se explica debido a que los aminoácidos libres en general no son efectivos para formar quelatos tanto en alimentos como en sistemas biológicos por lo que la proteólisis extensiva de proteínas alimentarias da como resultado la disminución de la actividad (Smaranayaka y Li-Chan, 2011). No obstante, existen reportes en los cuales, la actividad tanto quelante como antioxidante aumenta al incrementar el tiempo de hidrólisis; así lo reportan Martínez-Palma et al. (2015) en la actividad antioxidante y quelante en dos muestras de espirulina hidrolizadas

secuencialmente con pepsina y pancreatina; se generaron dos hidrolizados (GH= 31.4 y 36.7). La actividad antioxidante evaluada por diferentes métodos incrementó conforme aumentaba el grado de hidrólisis. Por otro lado, los hidrolizados proteicos de ambas muestras mostraron actividad quelante de Fe^{2+} y Cu^{2+} .

Considerando lo anterior, la extensión del tiempo de hidrólisis genera péptidos de menor peso molecular (Becerril, 2017), pero no asegura una mayor AQC y AQF. pero el tiempo de hidrólisis se extiende para generar péptidos con estructura aminoacídica variable, ya que como se explica más adelante la composición aminoacídica es relevante para el tipo de bioactividad y capacidad que presentan los hidrolizados.

Otro aspecto por destacar es que la AQF fue mayor a la AQC, lo cual podría deberse a que los quelatos de hierro son más estables, ya que los quelatos de Fe^{2+} casi no permiten metal libre en solución, mientras que los quelatos de Cu^{2+} permiten cantidades significativas de iones metálicos libres en solución.

De acuerdo con diversos estudios tanto la quelación de Cu^{2+} como de Fe^{2+} está relacionada con la fuente proteica, el tipo de enzima utilizada para hidrolizar, el grado de hidrólisis, respecto a los péptidos está determinado por su estructura y configuración química.

Respecto a la composición aminoacídica se ha relacionado la actividad quelante de péptidos con la presencia de aminoácidos de tipo hidrofóbico, este hecho explica porque en las fracciones de A1 y G la actividad quelante es mucho menor comparada con los hidrolizados de ambas fracciones, ya que las proteínas en la estructura terciaria o cuaternaria los aminoácidos hidrofóbicos se concentran en el centro de la proteína, pero al desnaturalizar e hidrolizar quedan expuestos los aminoácidos hidrofóbicos para favorecer la actividad quelante. Esto es congruente con otros trabajos como el realizado por Guzmán Méndez (2013) en proteínas de *Phaseolus vulagris*, reportan un incremento de la actividad de forma significativa en los hidrolizadas EHv y EHI en comparación con el material fuente., en otra leguminosa de interés como la soya se ha observado un incremento de la actividad quelante comparado con las proteínas sin hidrolizar (Singh et al., 2014).

Los porcentajes presentes en los hidrolizados de *A. hypochondriacus* son altos en comparación con los reportados en otras especies de plantas como en *Jatropha curcas L* para la cual se ha reportado aproximadamente un porcentaje de 30 % para el hidrolizado de proteína generado por subtilisina a 1 h de hidrólisis, en el cual las fracciones peptídicas que reportaron actividad quelante se caracterizan por presentar alto contenido en tirosina (Gallegos-Tintoré y cols. 2011).

Continuando con la composición aminoacídica, entre los aminoácidos hidrofóbicos relacionados con actividad quelante se encuentran la valina y la leucina, y como se ha reportado en otros estudios *A. hypochondriacus* presenta en su constitución molecular ambos aminoácidos, razón por la cual se presenta actividad en cada uno de los hidrolizados. Además, se ha identificado una relación entre la actividad quelante y el contenido en aminoácidos aromáticos, su mecanismo de acción se da mediante la estabilización de radicales mediante la donación de electrones, manteniendo su propia estabilidad por resonancia de su estructura (Hutschenreiter et al., 2003). Se sabe que además de la tirosina, la proteína de *A. hypochondryacus* presenta histidina, así que cuando se generan hidrolizados con histidina en el extremo N-terminal funciona como un efectivo quelante de iones metálicos. Se ha documentado que tanto aminoácidos ácidos como básicos tienen la capacidad para poder formar quelatos, como sabemos *A. hypochondryacus* se caracteriza por su contenido en lisina el cual es superior a la de otros cereales, por lo tanto, en este trabajo es muy probable que los péptidos generados por la hidrólisis presenten lisina y por lo tanto el grupo carboxilo y amino de las cadenas laterales de la lisina al disociarse donan protones y forman quelatos. Otros aminoácidos terminales que se han reportado son: Asp, Asn, Glu, Cis e His (Carrasco-Castilla et al., 2012; Cian et al., 2016). La semilla de *A. hypochondriacus* presentan tanto Asp como Glu (Montoya-Rodriguez et al., 2015) por lo cual es posible que los péptidos que se formaron a partir de la hidrolisis tanto de G como de A1 presenten en su composición estos aminoácidos como terminales promoviendo la formación de quelatos.

Nuestros resultados también son similares a los reportados por Carrasco-Castilla et al. (2012) en hidrolizados con pepsina y pancreatina en *Phaseolus vulgaris*, encontrando una actividad quelante de Fe^{2+} en la proteína sin hidrolizar de 22.87 % posteriormente al medir

la actividad en la fracción mayor a 1 kDa la actividad disminuyó (16.04 %), sin embargo en la fracción A1 menor a 1kDa la actividad aumentó 35.83 % y al disminuir el peso molecular la actividad bajo nuevamente hasta 8.56 %, en este estudio se atribuye la afinidad para formar quelatos al contenido en aminoácidos con carga negativa: Asp y Glu, ya que son deficientes en Cys, Met e His, la AQF fue menor a la encontrada en la AQC. Un estudio más reciente (Abd El-Fattah et al., 2017), muestra en hidrolizados de leche, utilizando por separado tres proteasas: tripsina, pepsina y papaína, que la actividad fue mayor con la hidrólisis realizada con papaína. La AQF incrementó al aumentar el tiempo de hidrólisis, sin embargo, con el tratamiento con tripsina se identificó una baja actividad después de aumentar el tiempo de hidrólisis, lo cual ha sido reportado en otros trabajos (Lou et al., 2014).

Además de la composición aminoacídica también influye el peso molecular. A este respecto Cian et al., (2016) en *Pyropia columbina* identifican dos hidrolizados con actividad quelante, en los cuales se encuentra presente la histidina (20 y 30%) con pesos moleculares de alrededor de 270 Da, como se mencionó anteriormente los pesos moleculares de los hidrolizados en este trabajo también presentan pesos moleculares pequeños (Becerril, 2017).

Así mismo, se determinó el EC_{50} para la AQC en Alb1H24=0.973mg/mL y GloH24=1.7mg/mL; para la AQF= EC_{50} en Alb1H10.3=0.573mg/mL y GloH24=0.765mg/mL. Es importante mencionar que diversos trabajos solo reportan los porcentajes de quelación y no el valor EC_{50} , lo cual hace difícil la comparación con otros hidrolizados.

Actividad antioxidante (AAO)

En el área de los alimentos funcionales la actividad antioxidante es de interés. Los estudios realizados incluyen los de tipo *in silico*, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Específicamente en el género *Amaranthus* los estudios se enfocan en los compuestos polifenólicos presentes principalmente en las hojas y tallos, así como en la generación de polipéptidos de las semillas.

Al respecto las enzimas más utilizadas para la generación de estos polipéptidos bioactivos son la alcalasa y la flavourzima. En este estudio se utilizó la alcalasa para la generación de los hidrolizados debido a que se ha reportado una mayor actividad de los péptidos generados en comparación con otras proteasas, la evaluación de la actividad se hizo a través de los métodos de reducción de los radicales DPPH y. ABTS.

Los hidrolizados tanto de A1 como de G presentaron actividad reductora del radical DPPH. Como se observa en la tabla 5 el hidrolizado GloH88 alcanzó el porcentaje más alto 30.78 ± 0.76 % en comparación con Alb1H103 con un 23.72 ± 0.87 %; en ambas fracciones al continuar con la hidrólisis no se mostraron diferencias significativas. Estos resultados son similares al trabajo realizado por Soriano-Santos y Escalona Buendía (2015), respecto a los tiempos de hidrólisis reportan una mayor actividad de DPPH a las 8.8 h (47.9 ± 1.3 %) sin encontrar diferencias significativas a las 10.3 h en los hidrolizados de A1, para los hidrolizados de G el mayor porcentaje se refleja a las 8.8 h (53.2 ± 1.8 %). Sin embargo, el porcentaje en este estudio es ligeramente bajo, esto se debe probablemente a que la reacción entre el DPPH y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, en este caso debido probablemente al uso de etanol para realizar la técnica de DPPH durante la reacción, este provoca la precipitación de las proteínas provocando turbidez del medio de reacción la cual interfiere con la lectura de la absorbancia. Si bien la técnica de DPPH es ampliamente utilizada en estudios para evaluar la actividad antioxidante de péptidos en soluciones acuosas, se debe prestar atención con algunos tipos de muestra.

Tabla 5. Actividad antioxidante

T (h)	GH	ABTS		DPPH	
		A1	G	A1	G
3	10.33±.04 ^a	29.83±0.87 ^a	18.67±0.41 ^a	12.70±0.74 ^a	15.26±0.56 ^a
8.8	19.43±0.01 ^b	35.75±0.65 ^b	30.56±0.65 ^b	16.23±0.64 ^b	30.78±0.76 ^b
10.3	42.1±0.4 ^c	35.74±1.4 ^b	30.76±0.89 ^b	23.72±0.87 ^c	30.29±0.98 ^b
24	43.00±0.3 ^c	36.56±1.7 ^b	31.05±0.74 ^b	23.53±1.4 ^c	30.98±0.78 ^b
48	43.6±0.89 ^c	36.98±0.91 ^b	31.23±0.87 ^b	23.5±0.67 ^c	30.56±0.67 ^b

*Valores de la media ±desviación estándar (n=3).

Diferente letra en una columna indica diferencia estadística (P<0.05).

Los resultados sobre la AAO a través de la prueba de ABTS fueron favorables y superiores comparados con los alcanzados con la técnica de DPPH, esto se debe probablemente a que el ABTS utiliza agua como disolvente evitando la precipitación de las proteínas como ocurre con el DPPH. Los hidrolizados AlbH88 y GloH88 presentaron la mayor actividad con un 35.75±0.65 % y 30.56±0.65 % respectivamente. Al comparar los resultados nuevamente con el trabajo de Soriano-Santos y Escalona-Buendía (2015) encontramos un porcentaje ligeramente superior, sin embargo la evaluación que se reporta es de las fracciones completas, en A1 de 60.3 % y en G de 59.3 %.

Como se mencionó anteriormente la AAO no mostró incremento a partir de las 8.8 y 10.3 h, para poder explicar estos resultados, se debe tomar en cuenta lo mencionado por Dávila Ortiz y Jimenez Martinez (2017), la mayor capacidad de los péptidos con respecto a proteínas de mayor tamaño para disminuir la reactividad de una especie se relaciona con una mayor exposición de los aminoácidos. Todos los aminoácidos tiene la capacidad para interactuar con radicales libres, no obstante, existen aminoácidos con mayor capacidad de reacción, por tanto, los residuos de aminoácidos específicos en las secuencias son cruciales para la reducción de radicales libres.

La AAO de los hidrolizados de A 1 y G, se relaciona con la presencia de aminoácidos que se han identificado con una alta reactividad como la cisteína, la histidina dada por su grupo imidazol, ya que tiene alta capacidad reductora de radicales libres; incluso se ha reportado que la supresión de residuo His (H) de la zona C-terminal reducía significativamente el poder antioxidante; al respecto Chen et al. (1996), midieron las actividades antioxidantes de 28 péptidos; reportando: la remoción del residuo de His del extremo C-terminal disminuyó la AAO, mientras que al eliminar la Leu del extremo N-terminal no tuvo efecto. Dentro de la secuencia peptídica, los residuos de His y Pro desempeñan una función importante para la AAO. La secuencia Pro-His-His, presentó la mayor actividad. Además, reportaron una mejor sinergia entre péptidos con la secuencia Pro-His-His con antioxidantes como el tocoferol, y el hidróxido anisol (BHA).

La tirosina (a.a aromático) también se ha identificado por su alta reactividad (Elias et al., 2008; Zhang et al., 2010; Loganayaki et al., 2011). En relación con la presencia de aminoácidos aromáticos Nardo (2017) identifica en *A. mantegazzianus* péptidos con actividad reductora de radicales libres, con la finalidad de evaluar la relación entre la estructura de la secuencia de aminoácidos y la bioactividad. Orsini Delgado et al. (2016) también reportan péptidos con presencia de a.a aromáticos de la fracción de globulina 11S. Saito et al. (2003), también estudiaron la AAO en péptidos sintetizados a partir de dos bibliotecas de tripéptidos. De acuerdo con sus resultados los péptidos con residuos His o Tir, y tripéptidos con dos residuos de Tireran más activos comparados con péptidos con dos residuos de His. La secuencia Tyr-His-Tyr presentó una fuerte afinidad con antioxidantes fenólicos. A partir de estas investigaciones podemos inferir que aquellos péptidos con aminoácidos como residuos de Trp o Tir en el extremo C-terminal poseen mayor capacidad de reducción de radicales libres (Saito, et al., 2003).

La leucina presente en las proteínas de *A. hypochondriacus*, aumenta la presencia de péptidos en la interfaz agua lípido, además, mediante la adición de una leucina o prolina en el extremo N-terminal de un dipéptido His-His se mejora la actividad reductora de radicales libres (Ranathunga et al., 2006).

Cabe señalar que, se ha encontrado que, en su forma libre, generalmente los aminoácidos presentan baja o nula actividad antioxidante, de hecho, existe evidencia de que una hidrólisis extensiva de las proteínas resulta en un decremento de la AAO (Kong y Xiong, 2006; Salgado et al., 2011), lo cual es evidente en los resultados encontrados (Tabla 5). Esto puede atribuirse a las propiedades tanto químicas como físicas dadas por la secuencia de aminoácidos y la estabilidad del radical que se genera para no iniciar reacciones oxidativas.

Estos resultados aportan más evidencia a el supuesto de que tanto la naturaleza como la composición de los péptidos, son factores determinantes en la actividad antioxidante de los mismos.

El grano de amaranto es una fuente importante de hidrolizados con AAO al presentar una concentración relevante de lisina (3.2 a 6.4 %), triptófano, histidina y aminoácidos azufrados (2.6 a 5.5 %) principalmente (Segura Nieto et al.; 1994; Gorinstein et al., 2001).

Después de identificar los hidrolizados con el mayor porcentaje se procedió a calcular el EC_{50} para DPPH en Alb1H103= 0.767 y GloH88=0.432 y ABTS Alb1H88=0.876 y GloH88=0.324; la concentración mínima para reducir radicales libres fue menor para para la prueba de DDPPH con AlbH103 respecto a la prueba de ABTS siendo inverso el resultado con GloH88.

Evaluación de condiciones de tratamiento

En el apartado anterior se identificaron los hidrolizados con las más altas capacidades para cada una de las bioactividades descritas (AIECA, AAT, AAO, AQC y AQF). Estos hidrolizados pueden tener potencial para ser utilizados como ingredientes funcionales y desarrollar diversos productos en el área de los alimentos o incluso en el caso de la AAO utilizarse para la conservación de alimentos. Por consiguiente, en este apartado se abordan los resultados sobre la estabilidad de estos hidrolizados bajo condiciones para el procesamiento de alimentos.

Efecto del tratamiento térmico sobre actividades biológicas

El tratamiento térmico es el método más común e importante en el procesamiento de alimentos. En consecuencia, el aseguramiento de la bioactividad de los ingredientes de alimentos funcionales, por lo tanto, deben ser estables durante los tratamientos térmicos.

Para las pruebas de estabilidad térmica se trabajó con los hidrolizados Alb1H103, Alb1H24, GloH88 y GloH24. Se realizaron las pruebas de estabilidad considerando los pHs más frecuentes en la elaboración de alimentos 4.0 y 7.0 a 40 °C a 20 °C, durante 1 h, sobre las actividades AIECA, ATA, AAO (DPPH y ABTS) y AQ (Cu²⁺ y Fe²⁺).

Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre la AIECA

Los resultados en los siguientes tratamientos: Alb1H103 y GloH88 no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las actividades AIECA y AAT en ambos pHs (4.0 y 7.0) hasta una temperatura de 100 °C (Figura 8 y 9). Esto indica que los péptidos presentes en un medio ácido o alcalino débil pueden resistir el proceso térmico de 40°C a 100°C. Sin embargo, a 120 °C de tratamiento, la bioactividad correspondiente comienza a disminuir en comparación con el hidrolizado sin tratamiento.

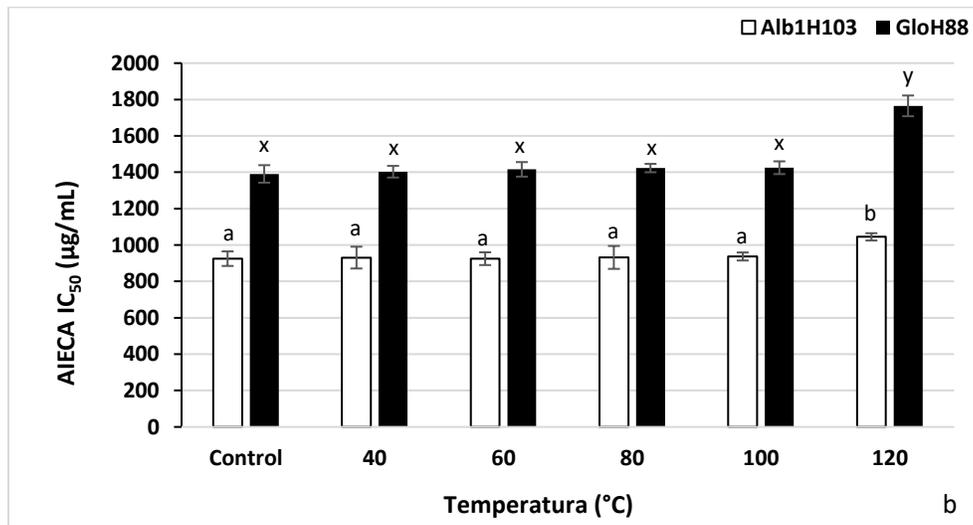
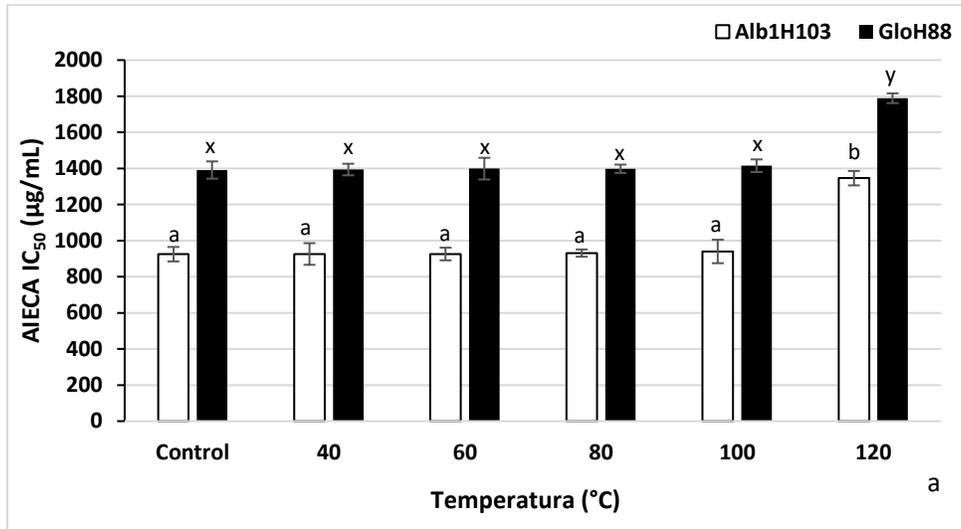


Figura 8. Valor IC_{50} como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 C), a pH 4.0 (a) y pH 7.0 (b) durante 1 h de hidrolizados del amaranto sobre la AIECA.

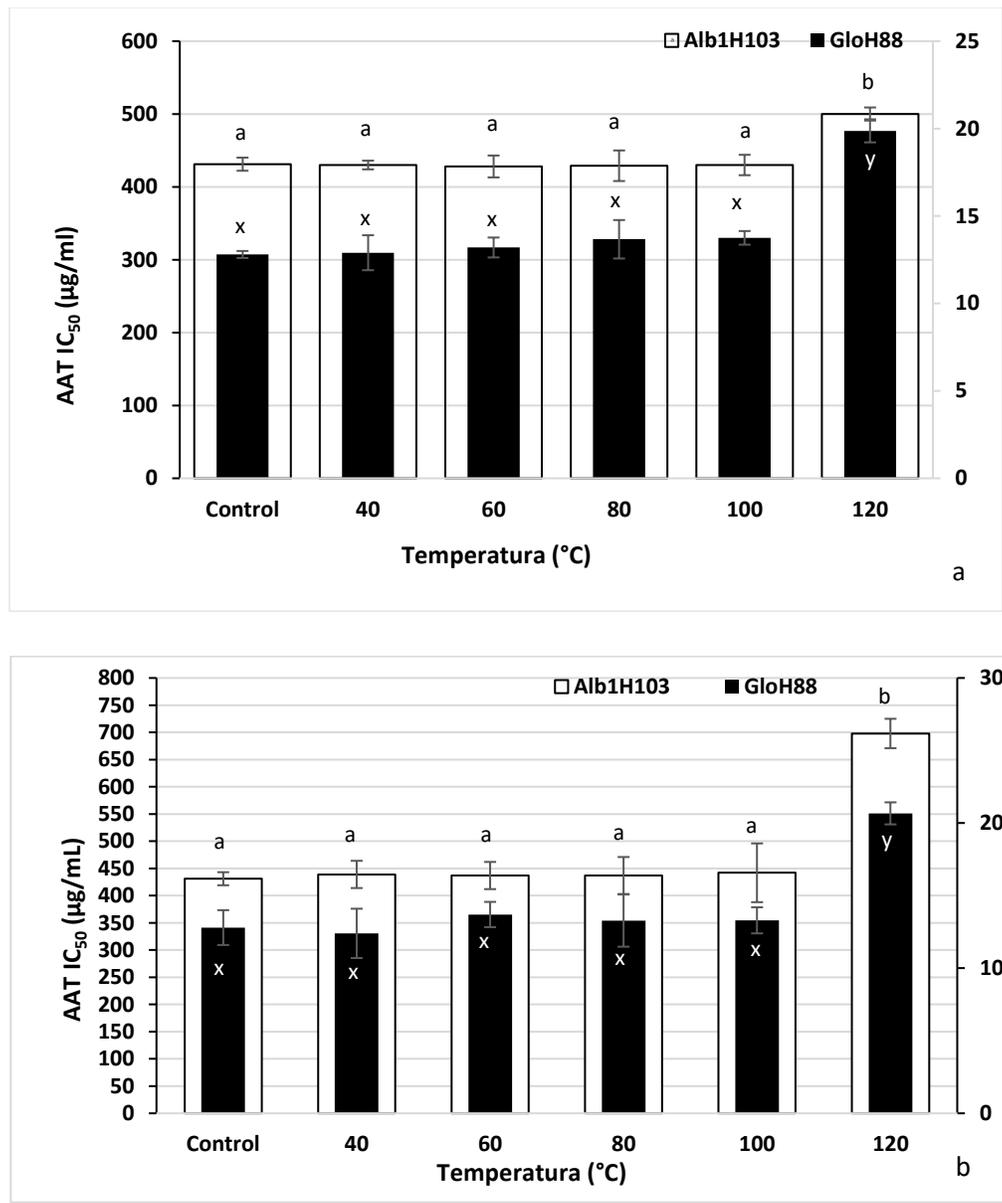


Figura 9. Valor de IC₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 C). a pH 4.0 (a) y pH 7.0 (b) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AAT

Una vez confirmado que el tratamiento con hidrolizado a 100 ° C mantenía la actividad biofuncional, se evaluó el efecto del tiempo en el tratamiento térmico. Con respecto al hidrolizado no calentado, no hubo pérdida estadísticamente significativa de bioactividad bajo

tratamiento térmico durante 3 h a pH 4.0, por otra parte, se muestra que Alb1H103 y GloH88 mantuvieron la actividad inhibitoria de ACE y AAT a pH 7.0 durante 3 h. cuando se comparó con el control, no hubo pérdida estadísticamente significativa de bioactividades en GloH88 bajo tratamientos térmicos sólo durante 2.0 h ($p < 0.05$) a pH 7.0 (Figura 10 y 11). La temperatura y el tiempo pueden ser factores cruciales que pueden conducir a la pérdida de bioactividad. Wu et al. (2014) encontraron que la AIECA de péptidos derivados de caseína bovina no mostró ningún cambio significativo después del calentamiento a diferentes temperaturas (40 a 100°C) a pH 7.0 después de 2 h de tratamiento, mientras que el tratamiento térmico durante 3.0 h o 4.0 h Disminuyó ligeramente la AIECA ($p < 0.05$). Estos autores afirman que la relación entre la estructura del péptido-bioactividad, incluso ahora, no está claro. El calor provoca la desnaturalización y la agregación de proteínas durante los cambios de temperatura de 60 °C a 90 °C, lo que puede causar que los péptidos de alta masa molecular formen grupos y, como resultado, pueden dificultar la capacidad de unión de la enzima. Por lo tanto, la bioactividad puede disminuir o perderse (Bloom et al., 2015). De acuerdo con la investigación de Wu et al. (2014), nuestro trabajo sugiere que los hidrolizados con AIECA podrían ser estables en los tratamientos de calor y tiempo de los procesos alimenticios llevados a cabo en temperaturas que oscilan entre 60 °C y 100 °C y también por períodos cortos de tiempo. En un estudio realizado por Hwang (2010), los péptidos derivados de las proteínas del jugo de cocción de atún retenían AIECA. Presentaron una estabilidad aceptable después de varias temperaturas, niveles de pH y tratamientos a presión. De hecho, encontraron que el procesamiento térmico severo a 100 °C durante 30 min produjo cambios menores en los péptidos. De forma similar, Wu y Ding (2002) observaron que los péptidos derivados de la proteína de soja con AIECA también mostraban estabilidad a 100°C durante 30 min. Fu et al. (2015) estudiaron el efecto de diferentes temperaturas en la AIECA del colágeno y encontró que esto mantuvo su capacidad inhibitoria a temperaturas relativamente bajas (20-60 ° C). Por el contrario, después de calentar durante 2 ha 100 ° C, notaron una ligera reducción de la actividad inhibitoria. Finalmente. Mirzaei et al. (2020) reportan en péptidos sintéticos a tratamiento manteniéndose estables después de 1h y un decremento a partir de las 1.5 h.

Ahora bien, al evaluar el efecto de la temperatura sobre la AAT se observa en la Fig. 9 que la actividad hasta los 100°C en ambos hidrolizados no presenta cambios significativos,

siendo para Alb1H103 a pH 7 un $IC_{50}= 430$ mg/mL y a pH=4 un $IC_{50}=442$ mg/mL y para GloH88 a pH 7 un $IC_{50}=13.75$ mg/mL y a pH=4 un $IC_{50}=13.3$ mg/mL. Esto indica que los péptidos bajo condiciones de procesamiento térmico de 40 a 100 °C conservaran la actividad. Una vez demostrada la estabilidad de la AAT a 100°C, ambos hidrolizados se sometieron a una temperatura de 100°C a diferentes tiempos (1 a 4 h), como se observa en la Fig. 11 después de 4 h de actividad disminuye ya que el IC_{50} a un pH de 4 aumenta de 431.1 a 599 mg/mL, sin embargo, a pH de 7 la actividad permanece estable después de 3 h de tratamiento, pero después de 4 h la actividad disminuye. Respecto a la AAT los estudios realizados son escasos. No obstante, nuestros resultados son congruentes con los reportados por Sabbione et al., (2018), los cuales evaluaron la AAT, con harina de amaranto y después de la elaboración de galletas a partir de harina de amaranto. Para la elaboración de las galletas se trabajó con una temperatura de 105°C, reportan que existe una reacción dosis-respuesta, ya que al aumentar la concentración aumentaba la AAT, además observaron que la AAT se mantuvo estable. El IC_{50} reportado fue de 0.22 ± 0.04 mg/mL.

Con base en los datos anteriores, parece que los péptidos con AIECA son más estables en un rango de temperatura (20-100 ° C), al menos durante 1 h. Sin embargo, la pérdida de estabilidad de la bioactividad tendría que ser también evaluada bajo condiciones de tratamiento severas tales como esterilización, asado a la parrilla y fritura, y así sucesivamente, con el fin de asegurar que se recibe el beneficio fisiológico esperado de un alimento.

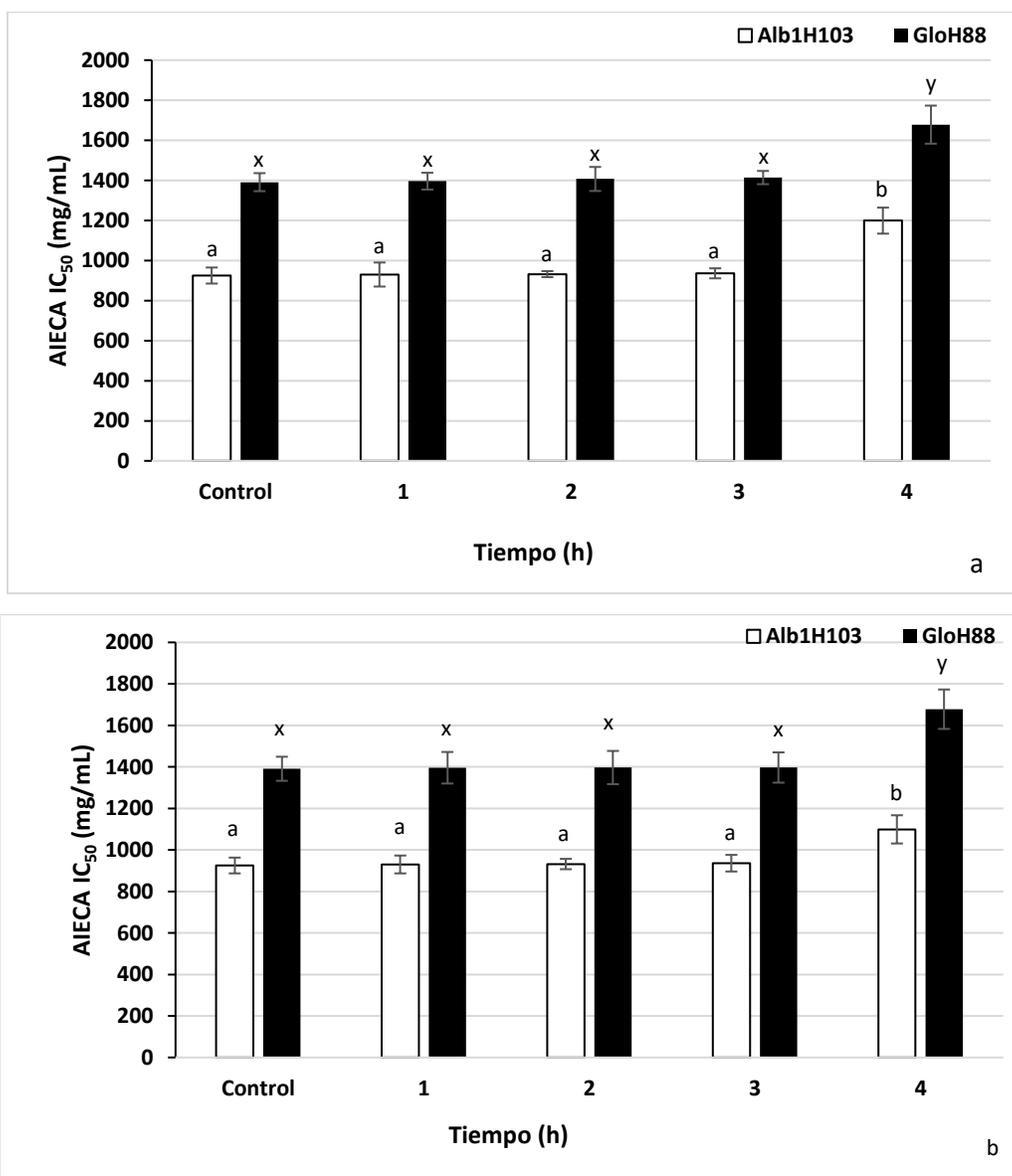


Figura 10. Valor de IC₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de los hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 ° C a pH 4.0 (a) y 7.0 (b) en la AIECA.

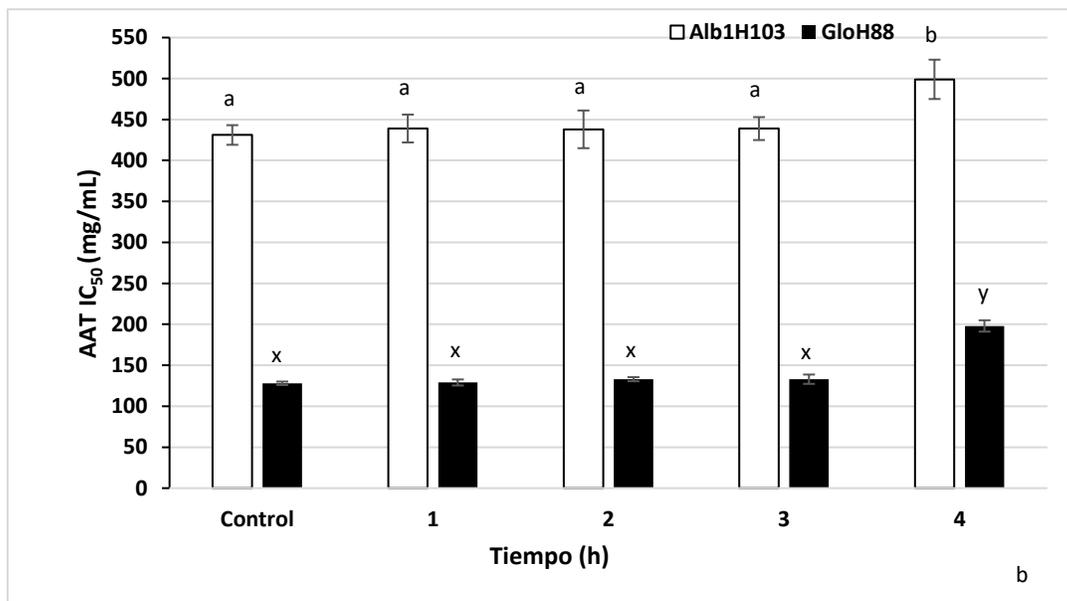
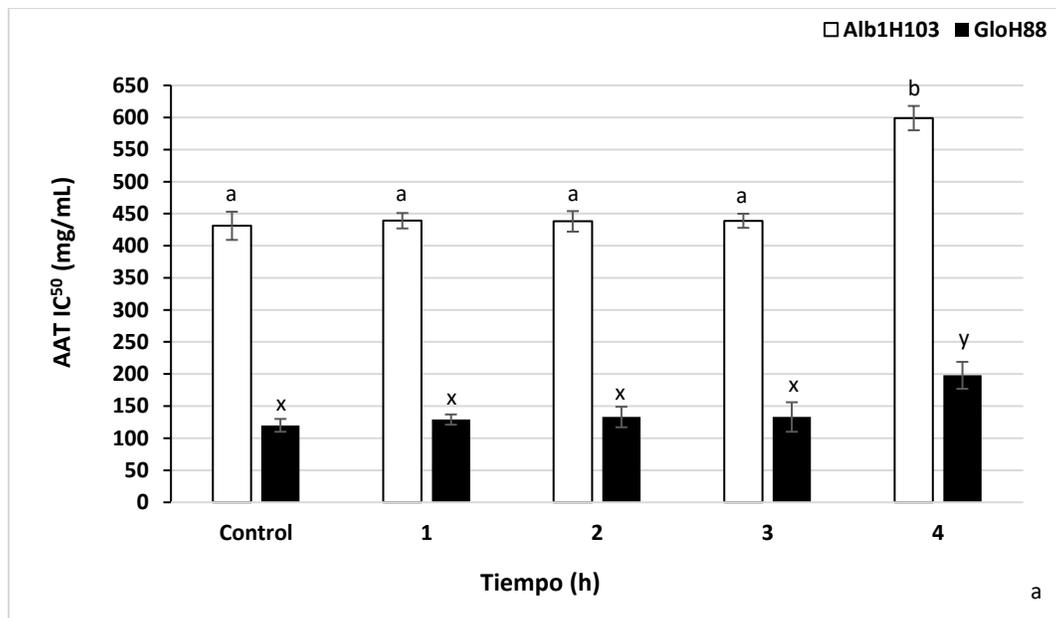


Figura 11. Valor de IC₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 ° C a pH 4.0 (a) y 7.0 (b) en la AAT.

Efecto del tratamiento térmico sobre la actividad quelante

Al realizar la evaluación del efecto del tratamiento térmico sobre la AQC se observa en los tratamientos a pH 7 que la EC_{50} disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a los 80 y 100°C, e incremento ($p < 0.05$) respecto al control a 120°C; en el caso de GloH24 se observa una disminución respecto al control a los 60°C. Cuando ambos hidrolizados se trataron a pH 4 se observa un incremento significativo de la EC_{50} a partir de los 40°C, esto se debe a que en general a pHs muy ácidos (2-3) o muy alcalinos (10-2) no se forman quelatos o la estabilidad de los formados es muy baja (Figura 12). Respecto a la AQF se mantuvo estable la actividad hasta los 100°C en ambos hidrolizados a pH 7.0 y 4.0 (Figura 13).

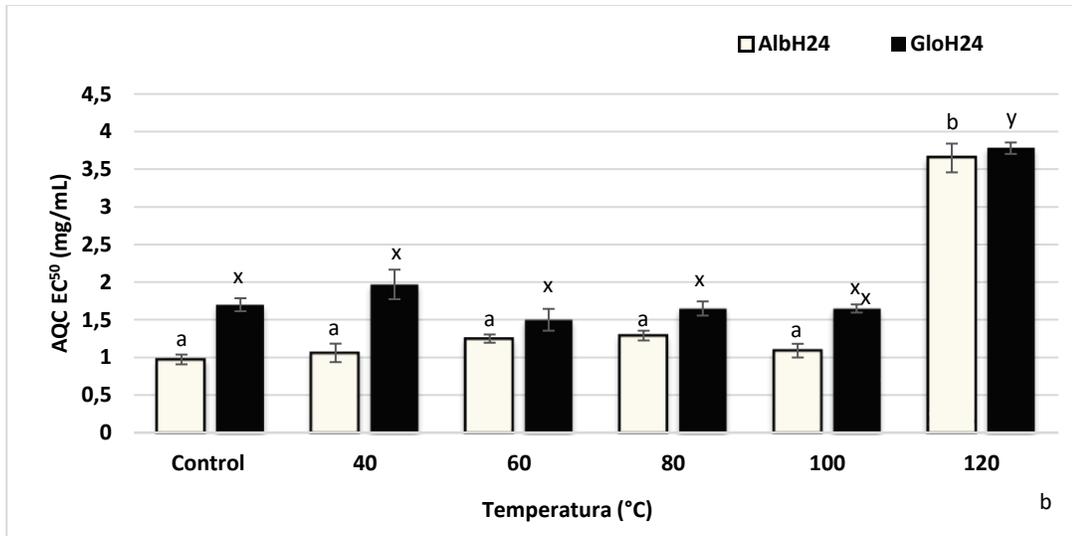
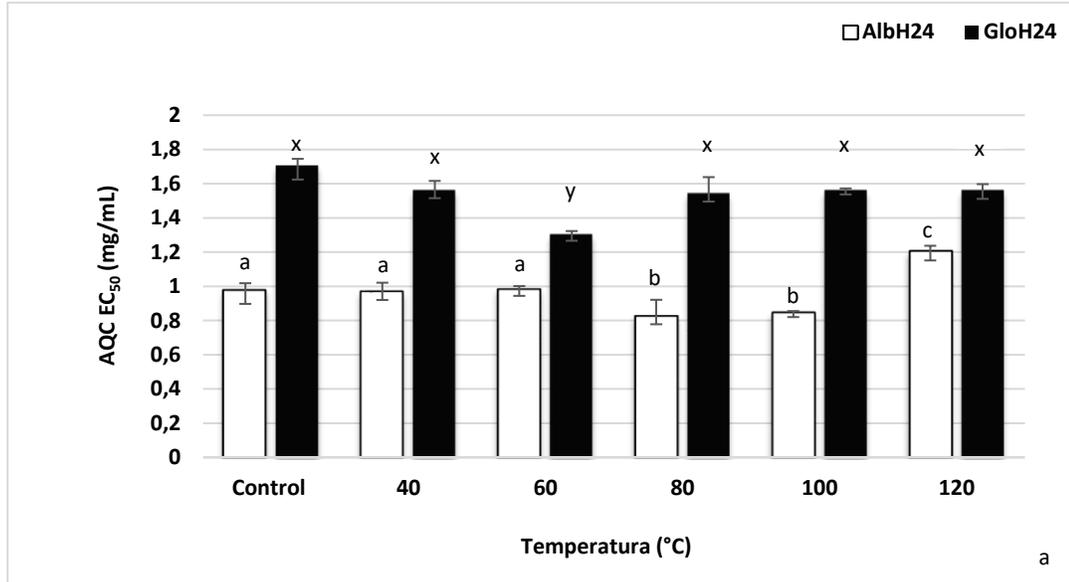


Figura 12. Valor de EC₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (b) y pH 7.0 (a) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AQC.

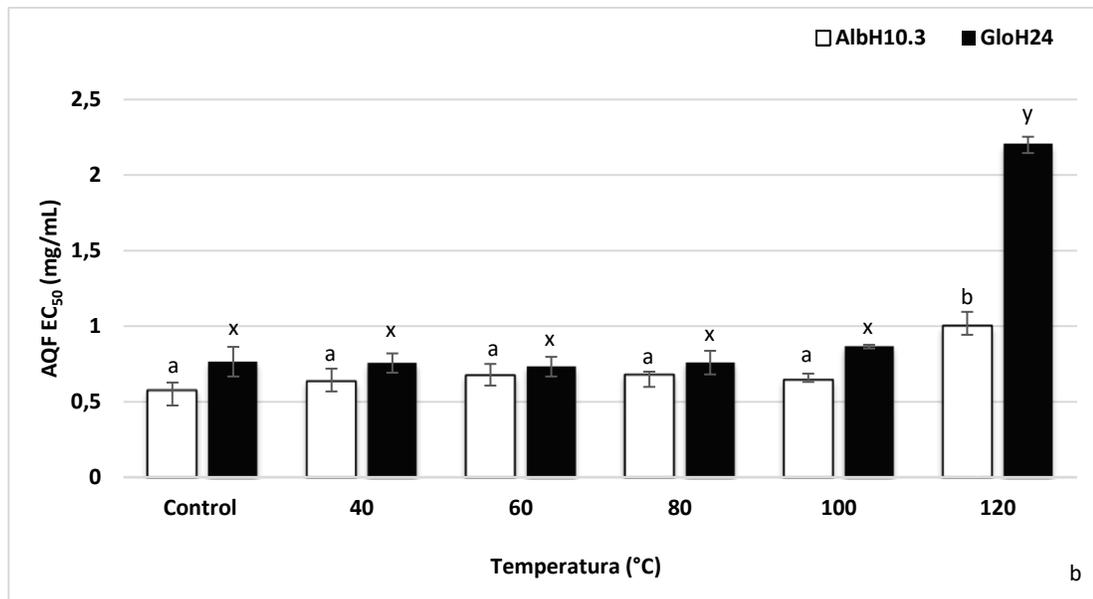
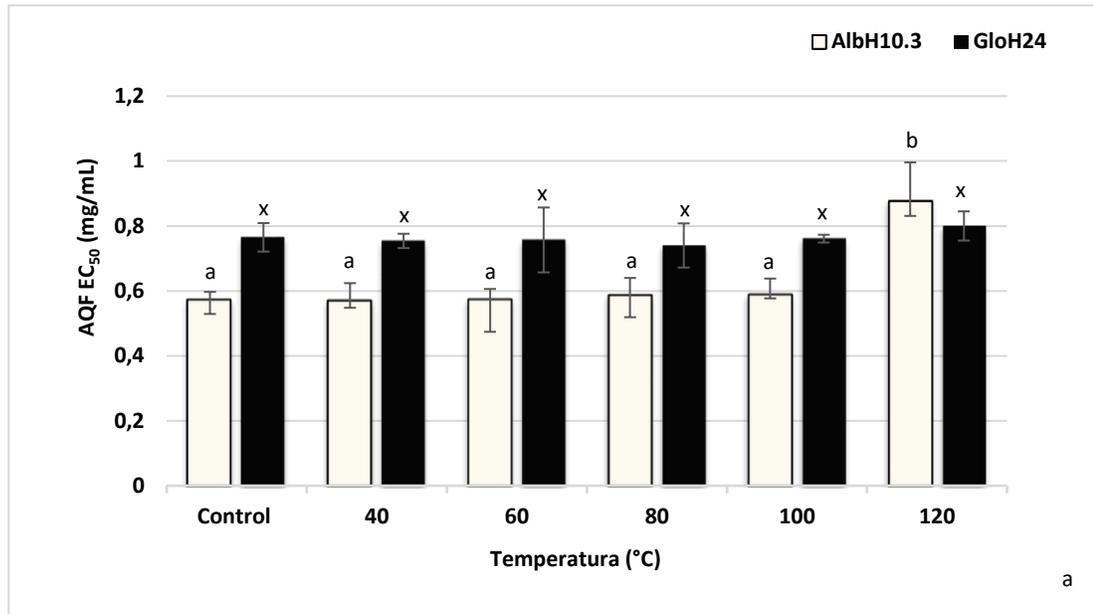


Figura 13. Valor de EC_{50} como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (b) y pH 7.0 (a) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AQF.

A partir de los resultados obtenidos podemos inferir que en particular la actividad quelante a diferencia de la AIECA y AAT, tanto el tratamiento térmico como el pH afectan la estabilidad de los hidrolizados. Los cambios en las actividades quelantes se dan debido al aumento de temperatura, esta produce cambios en la composición aminoacídica como lo demuestran trabajos como el realizado por You et al. (2012), al aumentar la temperatura (63, 100 y 121°C) el contenido de aminoácidos libres aumenta gradualmente de 1719.48 mg/100 mL a 1736.65 mg mL⁻¹. Entre los aminoácidos que incrementan se encuentra a la Gly, Arg, Thr, y Tyr. Los aminoácidos que mostraron un decremento fueron la Asp, Ser, Met, Cys, Trp y Lys. Así, se puede inferir que en los hidrolizados tanto de AlbH124 y Glo24 para la AQC y Alb1H103 y Glo24 para la AQF hubo cambios por aumento o decremento de aminoácidos.

El tratamiento térmico además de tener un efecto sobre la composición aminoacídica, también impacta en la configuración, permitiendo una mayor accesibilidad a los grupos quelantes de metales; similares resultados se han encontrado por otros autores, como el realizado por You et al. (2012) para evaluar la estabilidad de la AQC en hidrolizados tratados por 30 min a 63°C y 121 °C por 15 min de tratamiento térmico fueron significativamente mayor ($P < 0.05$) que las muestras tratadas a 100 °C por 20 min, sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Por ejemplo, cuando la concentración de péptido fue de 3 mg/mL, la actividad quelante de Cu²⁺ fue de 66.97 % para las muestras tratadas a 121 °C, 15 min, significativamente más alto que el de las muestras tratadas a 100 °C por 20 min ($P < 0.05$). La razón puede ser debido a la estructura peptídica específica y amino grupos de cadenas laterales ácidas que jugaron un importante papel no solo en la terminación de la cadena de radicales libres reacciones sino también en la quelación de iones de metales de transición (Zhu et al., 2008).

Al someter los hidrolizados a 100°C a pH 7 durante diferentes tiempos se observa que a las 2 h tanto para Alb24 como para Glo24 la EC₅₀ aumenta. Al someterlos a un pH de 4, nuevamente existe un aumento del EC₅₀ con mayor significancia a partir de las 2 horas de tratamiento. No obstante, los hidrolizados al mantener su estabilidad o incluso disminuir el EC₅₀ a temperaturas y tiempos de tratamiento térmico dentro de los rangos utilizados en la

industria de los alimentos pueden ser utilizados como ingredientes para el diseño de alimentos funcionales.

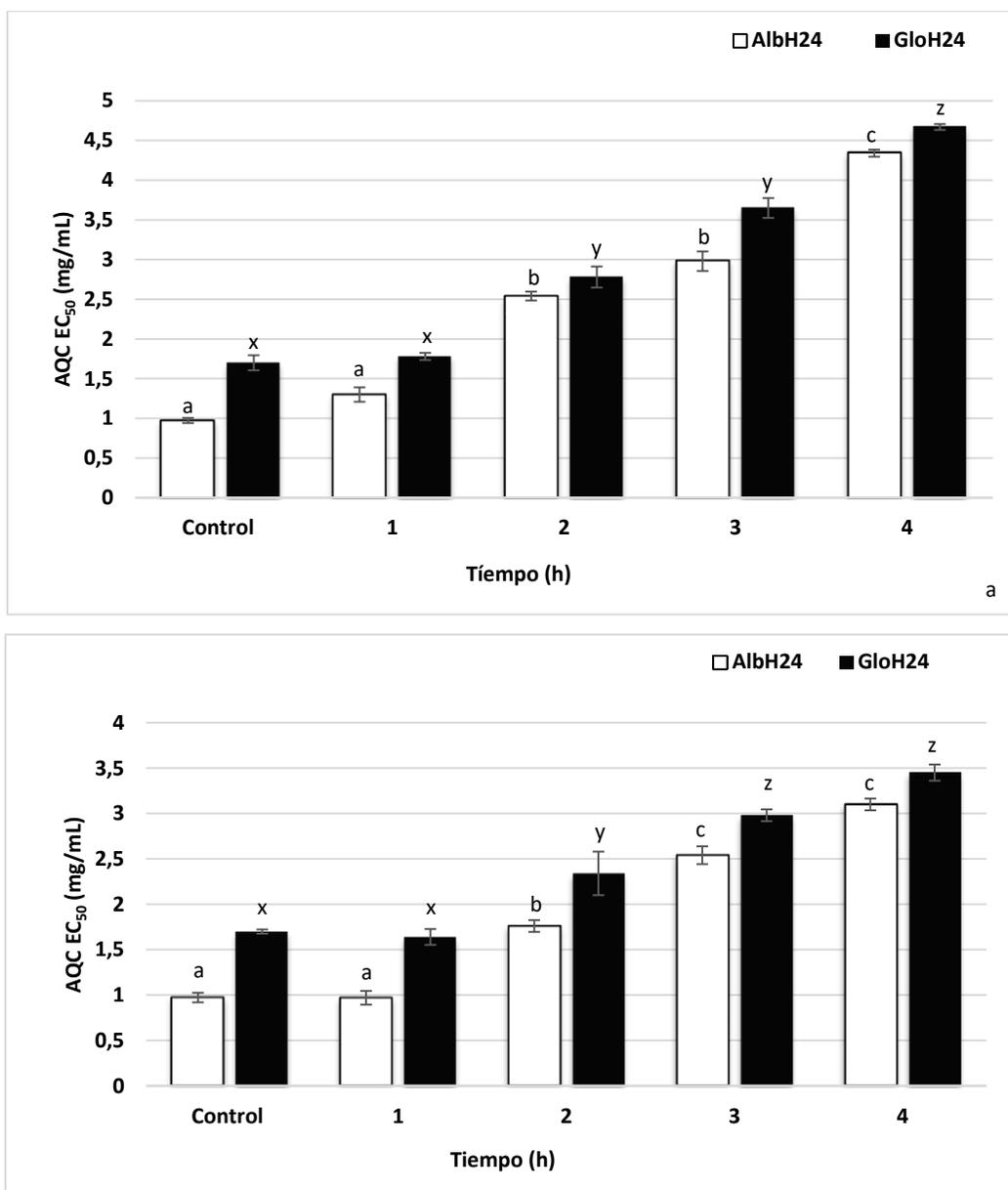


Figura 14. Valor de EC₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 ° C a pH 4.0 (a) y 7.0 (b) en la AQC.

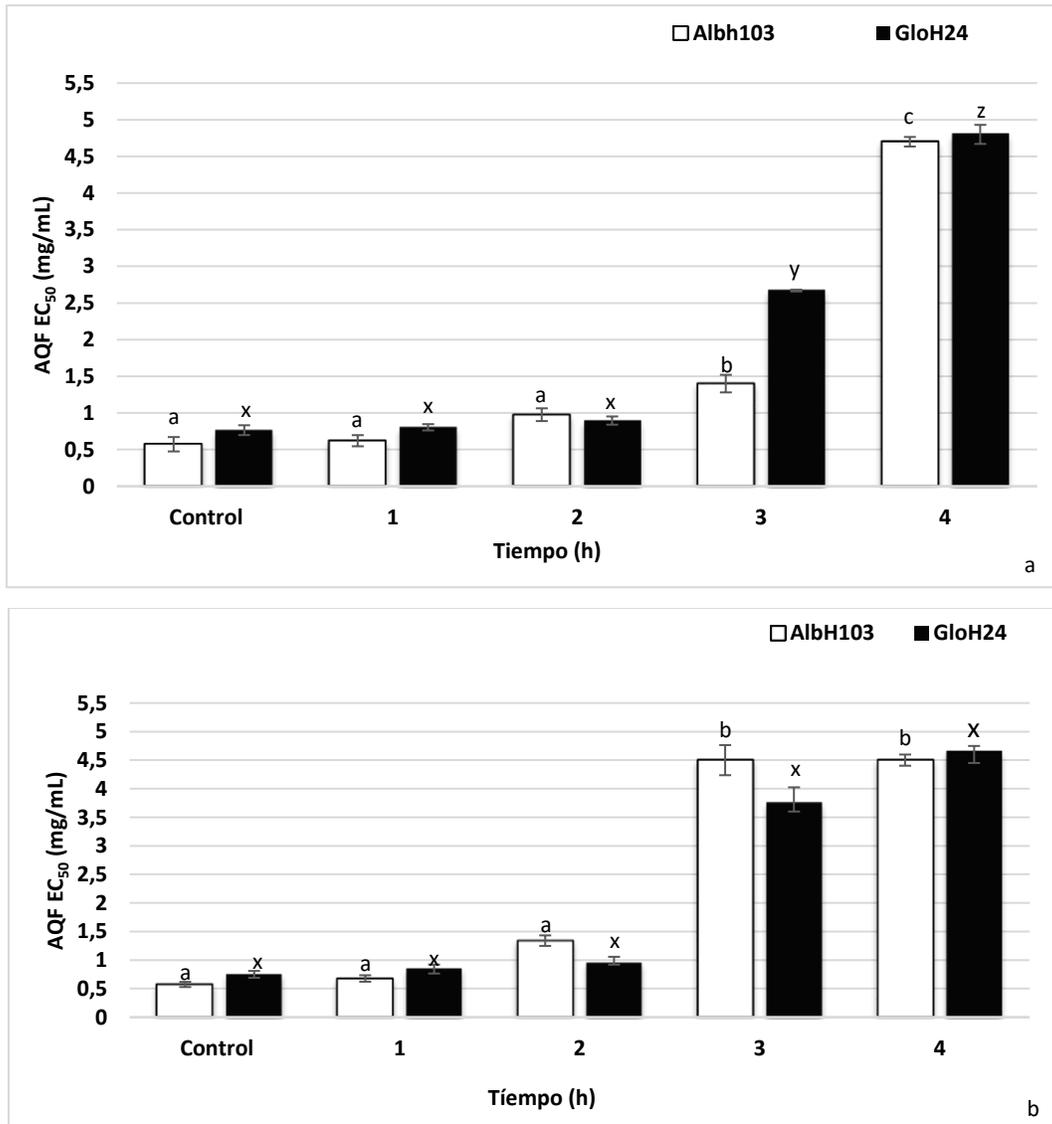


Figura 15. Valor de EC₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 ° C a pH 4.0 (b) y 7.0 (a) en la AQF

Efecto del tratamiento térmico sobre la AAO

El efecto del tiempo del tratamiento térmico sobre la AAO de Alb1H88, GloH88 y Alb1H103 tanto para la prueba con DPPH y ABTS se muestran en la figura 16 y 17. Cuando la temperatura era inferior o igual a 80° C, el cambio de temperatura no tuvo efectos significativos sobre la actividad reductora de radicales libres DPPH y ABTS, a una temperatura de 100°C la AAO aumentó ligeramente. Pero a una temperatura de 120°C el EC50 tuvo un decremento significativo. La capacidad para eliminar el radical libre DPPH mostró una tendencia positiva a medida que aumentaba la temperatura; siendo estable a temperaturas en intervalo de 40 a 100 °C. Estos cambios pueden argumentarse debido a que como ya se ha comprobado la temperatura es un factor crítico en la conservación de la estructura y por lo tanto bioactividad de las proteínas, en el caso de las cadenas cortas como los péptidos y polipéptidos de bajo peso molecular, sus actividades se ven alteradas por altas temperaturas debido a cambios en la estructura secundaria de los péptidos, considerando que no tienen estructuras terciarias y cuaternarias.

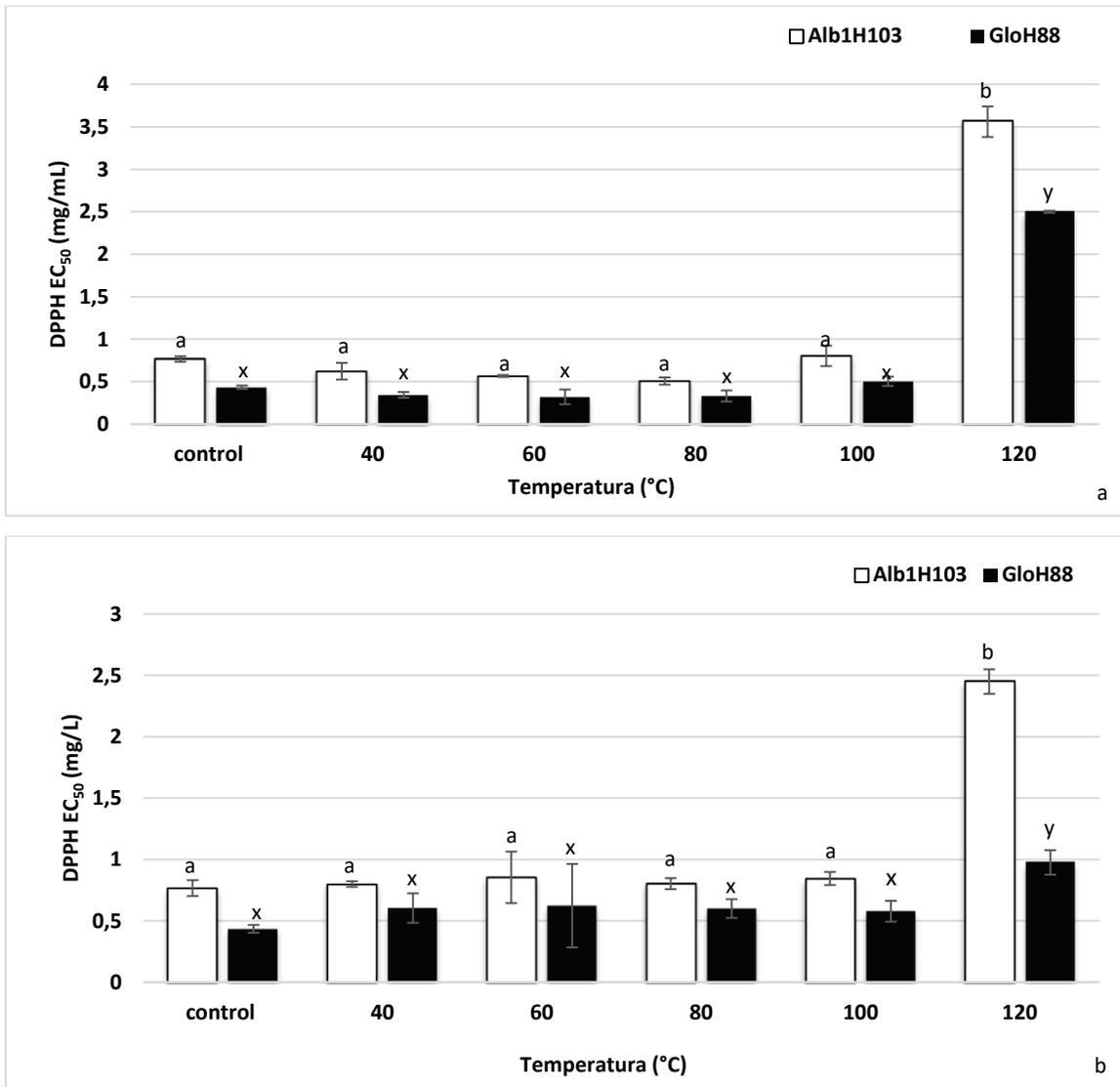


Figura 16. Valor de EC₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (b) y pH 7.0 (a) durante 1 h de hidrolizados de amaranto sobre la AAO.

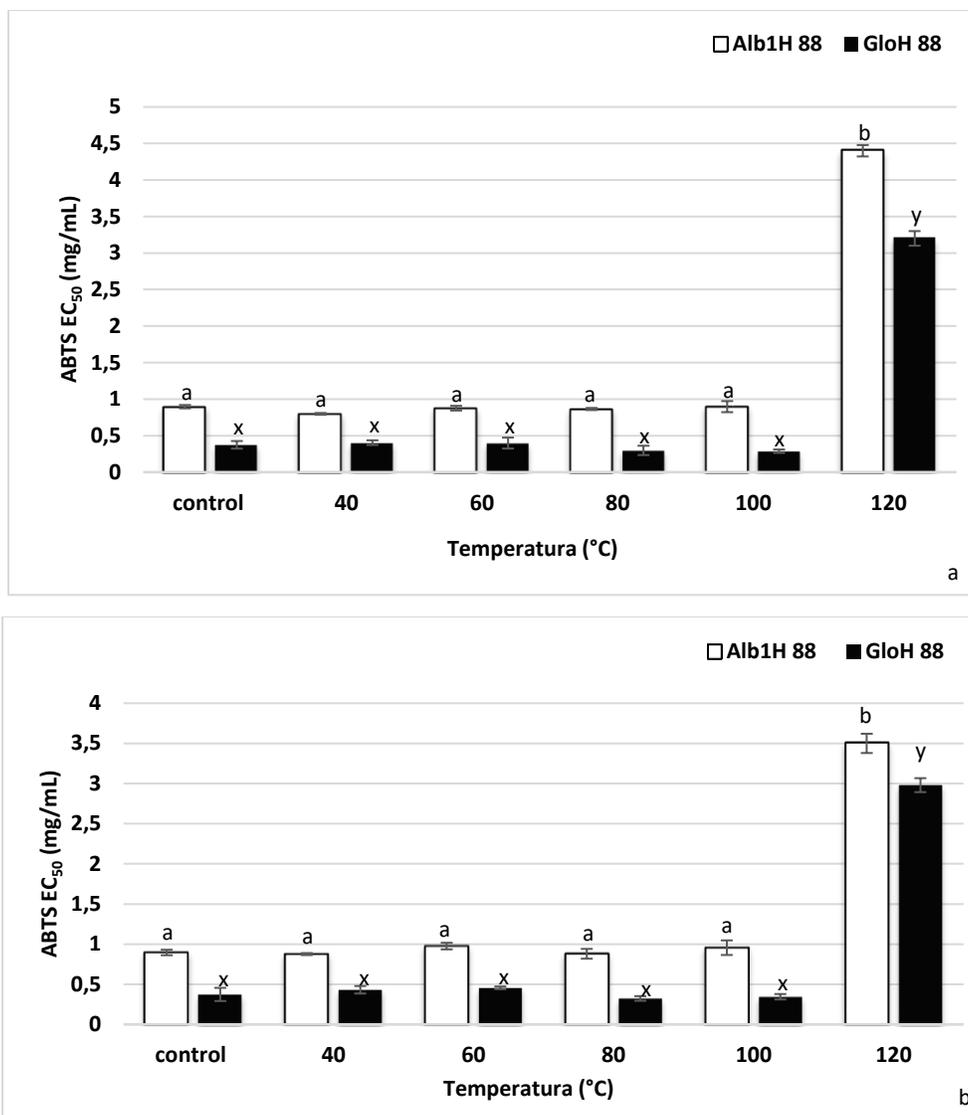


Figura 17. Valor de EC₅₀ como resultado del efecto del tratamiento térmico (40-120 °C). a pH 4.0 (b) y pH 7.0 (a) durante 1 de hidrolizados de amaranto sobre la AAO

Contrario a nuestros resultados Jang et al. (2016) encontraron que la actividad de los péptidos antioxidantes de hidrolizados de pez de arena inicialmente aumentó y luego disminuyó conforme aumentaba la temperatura de tratamiento del polipéptido de Ala-Thr-Ser-His-His. Cuando la temperatura alcanzó los 100 °C, la capacidad de eliminación de DPPH todavía era alta (66%). Por lo tanto, aunque las altas temperaturas pueden destruir la actividad antioxidante del GSH, otras actividades de los péptidos antioxidantes cambiaron ligeramente después del calentamiento.

You et al. (2012) reportan que, la actividad aumentó de 1.11 mg/mL a 1.65 mg/mL ($P < 0,05$) después del tratamiento a 63° C por 30 min, mientras que el tratamiento a 121°C, 15 min no produjo ningún cambio significativo de actividad. Esto se debe a que, durante el tratamiento térmico, la secuencia del péptido loach cambió y se expusieron más grupos de cadenas laterales de residuos amino hidrófilos (Zhu et al., 2008), lo que haría que los péptidos fueran más difíciles de reaccionar con los radicales DPPH solubles en lípidos. Por lo tanto, la actividad de captación de radicales DPPH disminuyó después del tratamiento térmico a 63 ° C, 30 min y 100 ° C, 20 min. Cuando se calienta a 121 ° C, 15 min, las pérdidas de antioxidantes naturales pueden minimizarse o compensarse mediante la formación de antioxidantes no nutritivos como los MRP u otros péptidos antioxidantes, que causaron la menor pérdida de la actividad captadora de radicales DPPH (Arcan y Yemeniciog , 2007).

Recientemente en péptidos sintéticos se observó que la AAO (por la técnica de DPPH y ABTS) se mantuvo estable a 50° durante 6 min. mientras que a 70 y 90 °C la actividad disminuyo. Los cambios que provoco el tratamiento térmico fueron para el péptido VL-9 causo un reemplazo de la Cys por la Pro en la antepenúltima posición, lo que derivó en un aumento de la captación de radicales catiónicos ABTS y DPPH. Sin embargo, en el péptido VCK-9) provoco una disminución en actividad reductora bajo condiciones de 70 y 90°C durante 6 min.

Con base a nuestros resultados y los reportados en los trabajos descritos anteriormente, la temperatura e incluso el tiempo del tratamiento térmico son sensibles al calor, el tratamiento térmico puede modificar la estructura secundaria de los péptidos y dar como resultado una disminución de la actividad antioxidante. La agregación también puede ser la razón de la actividad reducida; la agregación de péptidos está influenciada por la estructura y secuencia de péptidos, así como por las condiciones del tratamiento térmico. La agregación se puede formar mediante enlaces covalente tales como enlaces disulfuro, éster, amida, enlaces no covalentes mediante interacción hidrófoba. La cys tiene mayor susceptibilidad a la agregación inducida por calor a través de enlaces disulfuro y producción de dímeros o trímeros.

La mayoría de las tecnologías de procesamiento de alimentos implican tratamiento térmico; por tanto, estos péptidos antioxidantes son prometedores para su uso en la industria alimentaria

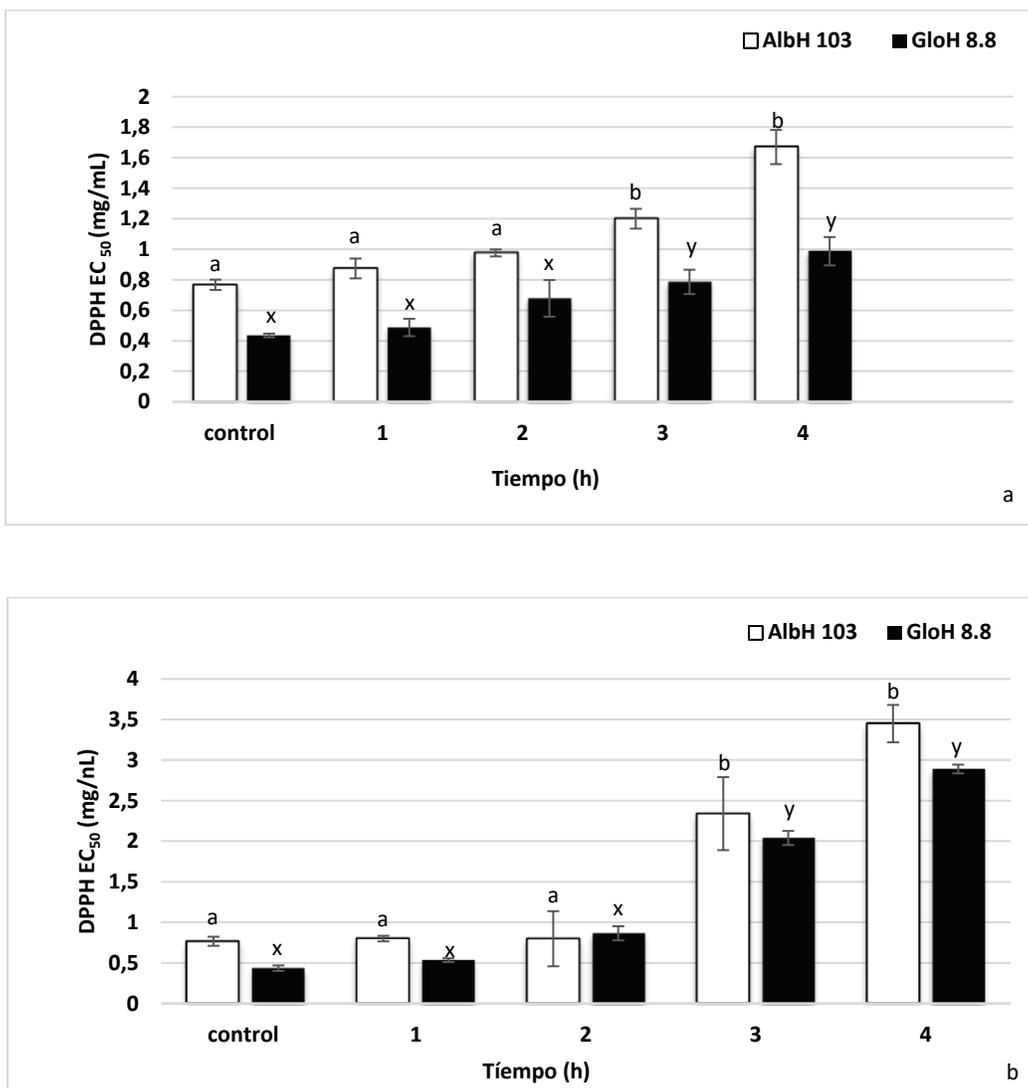


Figura 18. Valor de CI_{50} como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 ° C a pH 4.0 (a) y 7.0 (b) en la AAO.

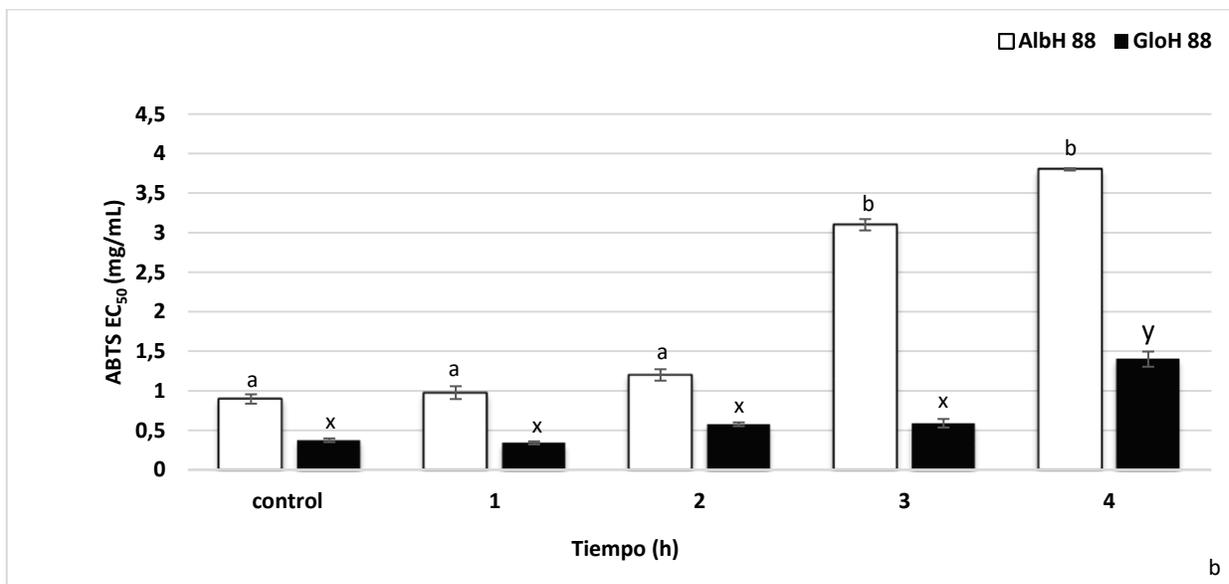
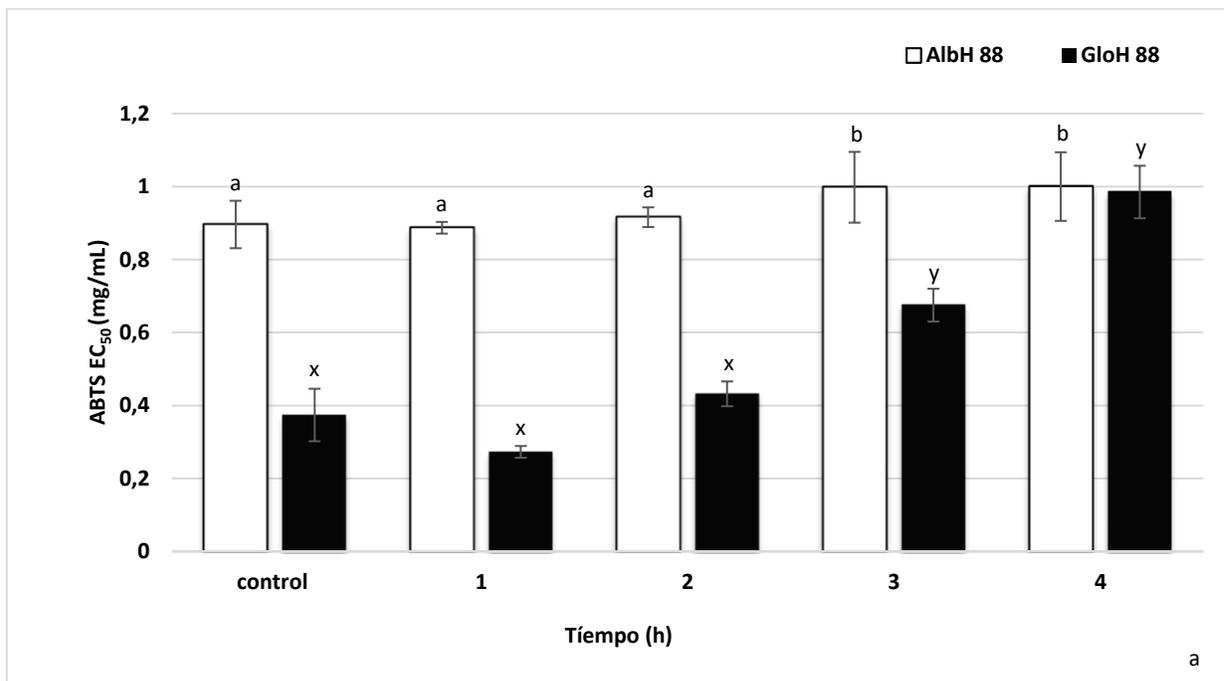


Figura 19. Valor de CI₅₀ como resultado del efecto del tiempo de tratamiento (1-4 h) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 ° C a pH 4.0 (b) y 7.0 (a) en la AAO.

Efecto del pH sobre las actividades biológicas de las proteínas de *A. hypochondriacus*

Efecto del pH sobre la actividad inhibitoria de la ECA y AAT

El efecto del pH se evaluó en un rango de 2.0 a 12.0 sobre la actividad inhibitoria de la ECA y AAT en los hidrolizados de Alb1H103, GloH88 respectivamente. Se seleccionó una T=100 °C durante 1 h este ensayo, no mostró pérdida de estabilidad de la bioactividad, por lo que cualquier cambio en ella tendría que atribuirse a la influencia del tratamiento del pH. Los cambios de bioactividad de diferentes fracciones de péptidos de hidrolizados de proteína de amaranto se muestran en la figura 20. La bioactividad depende en gran medida de la solubilidad del hidrolizado. En general, a medida que aumenta la solubilidad, disminuye el valor IC₅₀ de la bioactividad correspondiente. Por el contrario, a medida que disminuye la solubilidad, aumenta el valor IC₅₀ de la bioactividad correspondiente. En cuanto a Alb1H103, los valores de IC₅₀ de AIECA y AAT eran casi constantes dentro del rango de pH de 5.0 a 7.0; la actividad inhibidora más baja, para ambas bioactividades, se observó a pH alcalino (8.0-12.0). El valor de IC₅₀ de GloH88, para AIECA y AAT, se mantuvo constante, similar al del control, dentro del rango de pH de 2.0 a 8.0. A pH 9.0-12.0, aumentaron los valores de IC₅₀ de estos hidrolizados.

Similares resultados han sido reportados por Wu et al. (2014) para péptidos derivados de caseína. Estos indican que bajo condiciones alcalinas de tratamiento fuertes (pH cercano a 12) la actividad inhibitoria de la ECA se reduce esto puede ser debido a una desnaturalización e incluso hidrólisis de algunos péptidos con su consecuente inactivación provocada por el pH. Además, la modificación del pH puede provocar cambios fisicoquímicos de las proteínas como reacciones intermoleculares, reacción con azúcares, solubilidad y por lo tanto producir entrecruzamiento, destrucción de lisina ruptura inespecífica de péptidos y destrucción de aminoácidos sensibles a cambios de pH. Otra posible explicación es que los cambios de pH pueden afectar las propiedades bioactivas por modificaciones de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, tratamientos ácidos destruyen glutamina y asparagina mientras que tratamientos alcalinos destruyen cisteína, serina y treonina y produce lisinoalanina y D-aminoácidos (Korhonen et al., 1998). El pH de procesamiento de la mayoría de los alimentos es cercano a la neutralidad; hay pocos

alimentos de pH ácido y el tratamiento a pH superior a 7.0 es aún más escaso, por lo cual con base en esta experiencia su puede afirmar que el pH es el factor que menor efecto tendría sobre la actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados proteicos del amaranto.

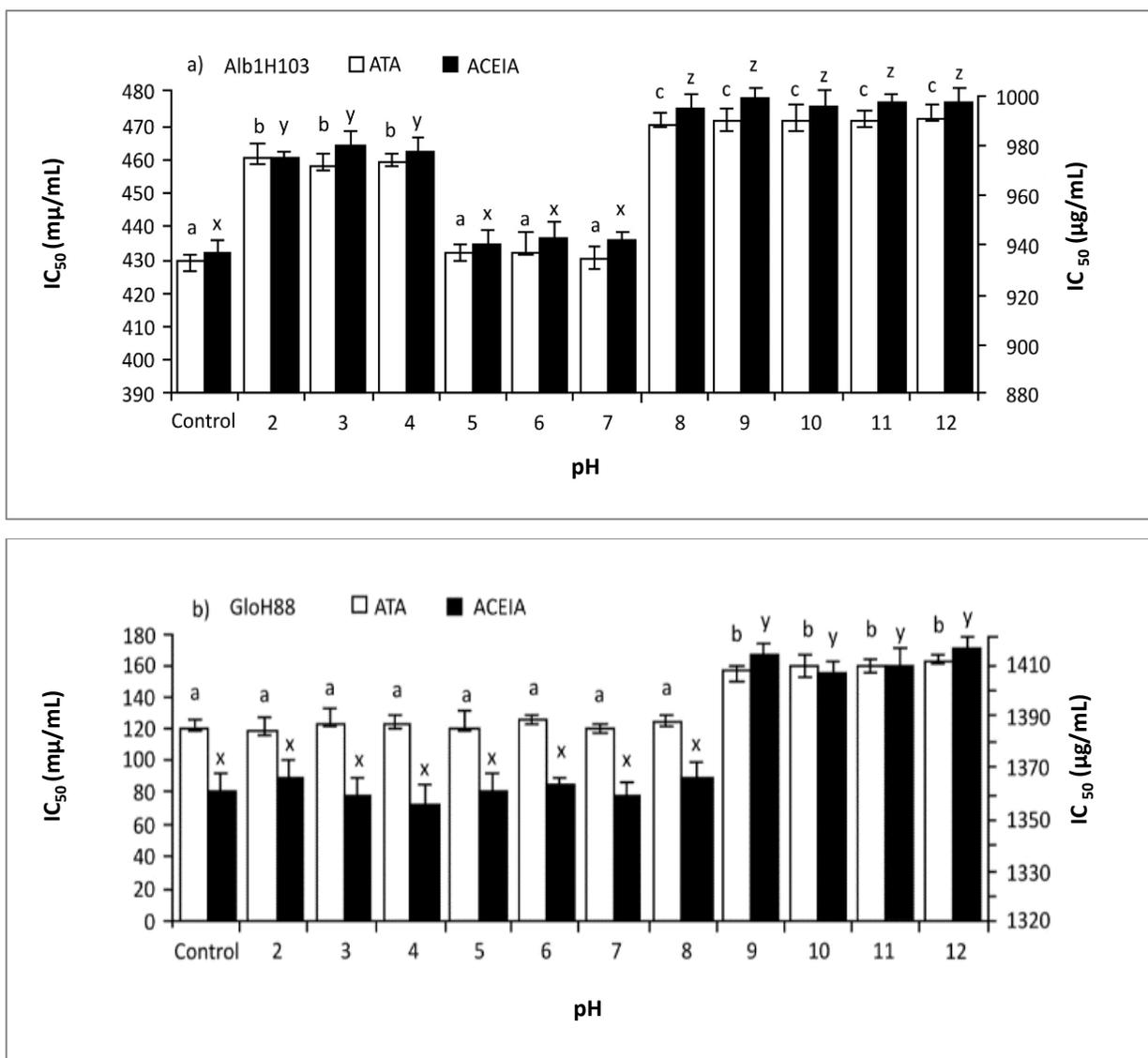


Figura 20. Valor de IC_{50} como resultado del efecto del pH (2-12) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 C durante 1 h sobre sus AIECA y AAT.

Efecto del pH sobre la AAO

Los efectos de pH sobre la actividad AAO de los hidrolizados se muestra en la figura 21 tanto Alb1H103 como GloH8.8 mostraron estabilidad en un rango de pH entre 4-8, se observó que bajo condiciones extremas de acidez o alcalinidad la actividad disminuyó. Estos cambios pueden atribuirse a que posiblemente se produzcan reacciones de racemización, formando una mezcla de isómeros L y D, esto afecta la actividad biológica entre isómeros; de hecho, en farmacología este tipo de reacciones son relevantes para la actividad de los principios activos. Este tipo de reacciones es probable se realicen bajo condiciones alcalinas (Zhu et al., 2014). Otro tipo de reacción es la desaminación, a valores de pH altos provocando cambios en la estructura y conformación. Lo que conlleva a cambios en la capacidad para reducir radicales libres. Los resultados de este trabajo son similares a los de Yuan et al. (2016) en péptidos de polilla de seda la reducción del radical DPPH fue máxima a pH 6, pero la actividad disminuyó tanto a condiciones ácidas o alcalinas, siendo el tratamiento alcalino con mayor efecto en la actividad. Además, la energía de activación de la degradación del péptido varía con los cambios de pH. En general, cada péptido tiene un rango de pH óptimo, dentro de este rango de pH la estructura es estable y por ende la actividad de los péptidos se puede mantener estable. Incluso las cadenas laterales de algunos péptidos pequeños pueden hidrolizarse mediante catalizadores alcalinos. En este trabajo de investigación se muestra mayor efecto a pH alcalino, similar a lo observado en las AIECA Y ATTA para este trabajo. Por otra parte, Wang et al. (2020) en péptidos de *Largehead hairtail* (pez faja) reportan que la tasa de eliminación del DPPH no mostró cambios significativos ($p < 0.05$) en solución a pH de 4, 6 y 8; mientras que la tasa de eliminación del radical DPPH disminuyó significativamente a niveles muy ácidos (pH=2) o muy alcalinos (pH=12). Estos autores también argumentan que la pérdida de actividad podría ser el resultado de la escisión intramolecular en solución ácida o una desaminación en solución alcalina.

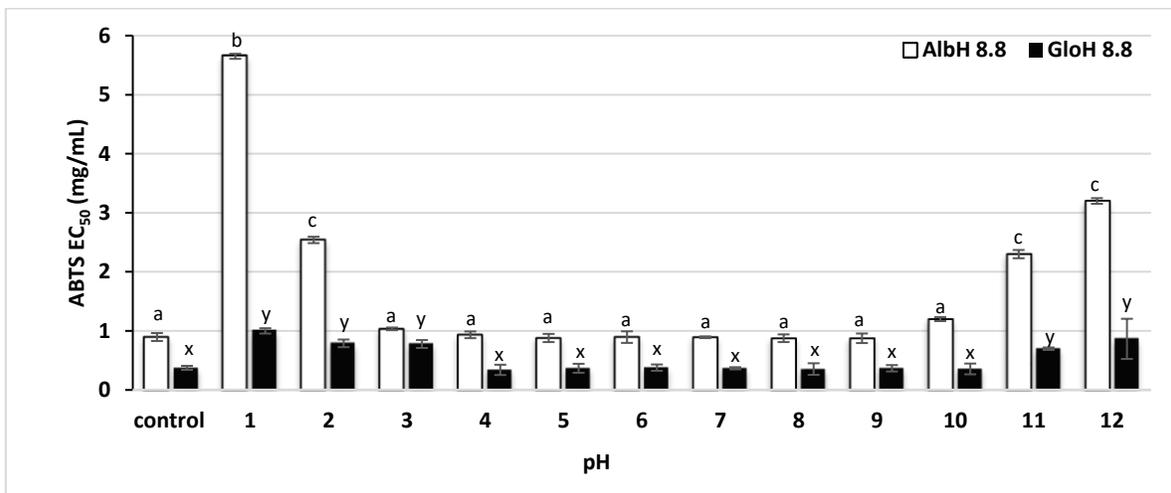
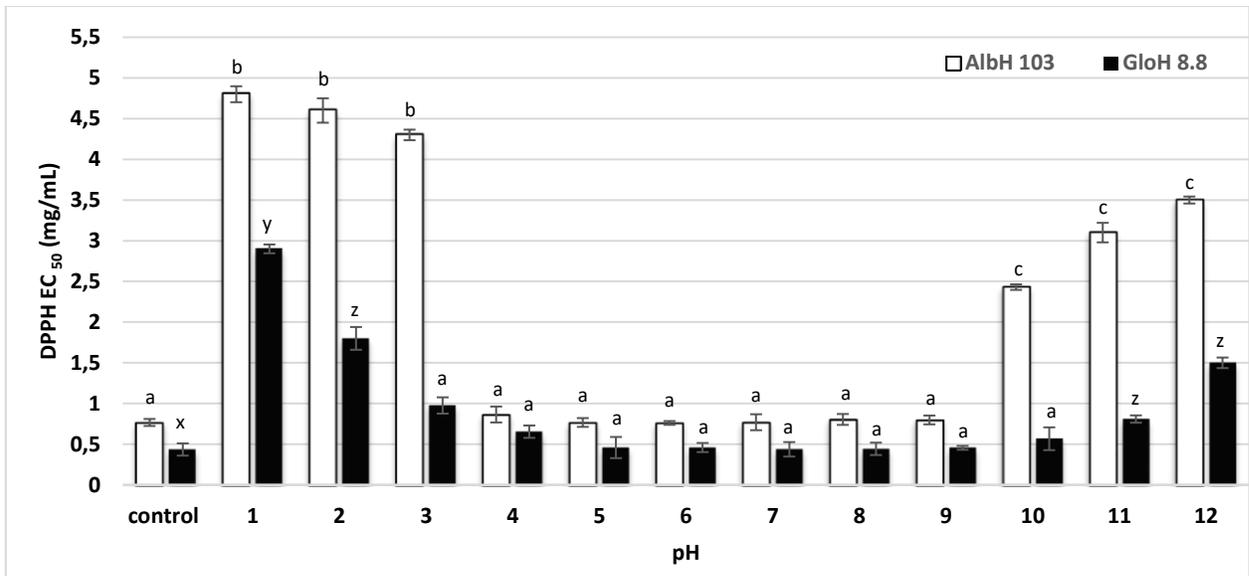


Figura 21. Valor de CI50 como resultado del efecto del pH (2-12) de hidrolizados de amaranto calentados previamente a 100 C durante 1 h sobre su AAO (DPPH y ABTS).

Al respecto, anteriormente se ha reportado estudios en los cuales la Asp-hexapéptido se escindió en dos partes, así como un tetrapéptido (Val-Tyr, Pro-Asp) y un dipéptido (Gly-Ala), mediante escisión intramolecular en condiciones muy ácidas (pH=0.3-3.0) (Oliyai y Borchardt., 1993). En lo concerniente a la desaminación Patel y Borchardt (1990) reportan que la desaminación aumenta con el incremento del pH en los rangos de pH de 5 a 12.

Recientemente Du et al. (2020) en péptidos de arroz integral al ser tratados a diferentes pHs encuentran a pH neutro una actividad de reducción del radical ABTS alta pero la actividad disminuye significativamente bajo condiciones muy ácidas o alcalinas; cuando el pH aumenta a 8.0, la actividad reductora del radical ABTS disminuyó bruscamente y a pH de 12 se redujo en un 40 % en comparación con la condición a pH neutro. Además, Mirzaei et al. (2020), al realizar ensayos de estabilidad sobre péptidos sintéticos, observan estabilidad hasta una temperatura de 70 °C y 90° C durante 6 min tanto para los ensayos de DPPH como para los ensayos de ABTS.

Los trabajos aquí reportados y los resultados obtenidos en este trabajo de investigación aportan evidencia sobre el efecto del pH sobre la actividad antioxidante de péptidos bajo condiciones extremas de acidez y alcalinidad, así como una actividad y estabilidad a pH neutro. Cada péptido tiene su rango de pH óptimo, más allá de este rango, la estructura del péptido cambia y su actividad se ve afectada, estos cambios pueden deberse a reacciones de racemización, desaminación, variación de la ruta de degradación y cambios producidos por las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados

Efecto del pH sobre la actividad quelante de Cu²⁺ y de Fe²⁺

El efecto del pH sobre la AQC fue similar tanto para Alb1H24 como GloH24, en este se observa un decremento de la actividad al cambiar el pH a valores muy ácidos (1-3) o alcalinos (10-29), manteniendo su estabilidad a pHs cercanos a la neutralidad, los resultados siguieron el mismo patrón para la AQF en Alb1H103 y GloH24; en general los quelatos o no se forman o son más inestables a pH muy ácidos o alcalinos (figura 22). En otros trabajos se ha observado el efecto significativo del pH sobre la estabilidad de los quelatos. Los efectos del pH sobre la estructura de quelantes afectan la estabilidad. Al someterlos bajo condiciones

ácidas fuertes, el H^+ compite con los iones metálicos para obtener el electrón de los aminoácidos. En condiciones alcalinas fuertes, el OH^- compite con el grupo electrónico para obtener iones metálicos (Zhang et al., 2002). Ambas condiciones provocan inestabilidad de los quelatos formados bajo condiciones de pH cercanas a la neutralidad.

Anteriormente, se mencionó que uno de los aminoácidos que participan en la AQC y AQF es la histidina presente en las proteínas de *A. hypochondriacus*, y se puede inferir que la histidina es uno de los aminoácidos sensible a los cambios de pH y por lo cual la actividad presenta inestabilidad bajo condiciones fuertes de acides y alcalinidad.

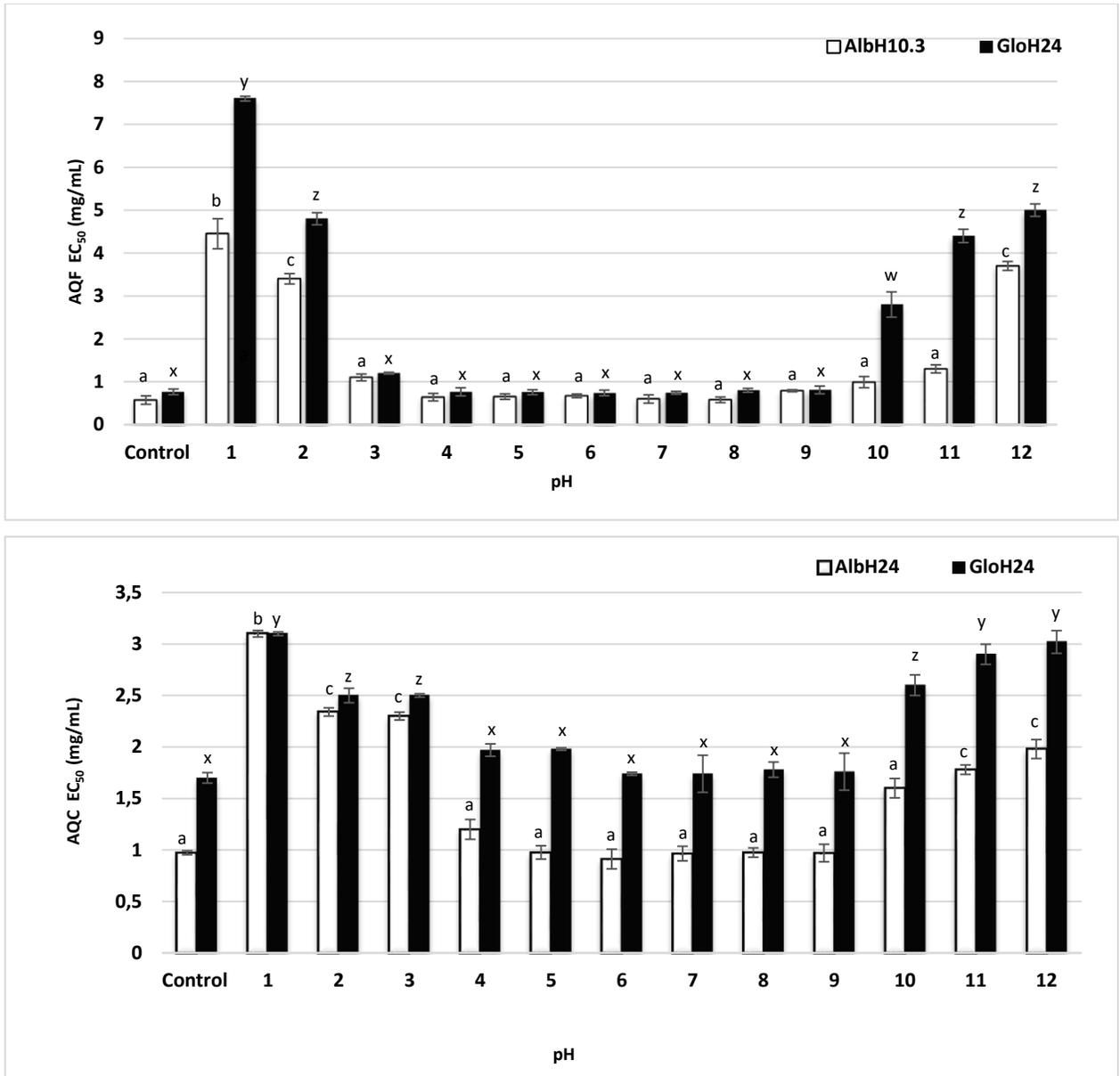


Figura 22. Valor ICI₅₀ como resultado del efecto del pH (2-12) de hidrolizados de amaranto seleccionadas calentadas previamente a 100 C durante 1 h sobre sus AQC Y AQF.

De acuerdo con Arévalo et al. (2008) en un estudio encontró que el pH modifica el efecto que ejerce la histidina sobre la oxidación de ascorbato por Cu^{2+} ; en un rango de pH comprendido entre 3.9 y 8.0, se observa que, a medida que se incrementa el pH, la actividad quelante de la histidina aumenta, pero, disminuye al aumentar la alcalinidad. Además, la actividad quelante estuvo correlacionada con la concentración de histidina a pH 8.0.

Efecto de una simulación digestiva gastrointestinal sobre la actividad inhibitoria de la ECA y AA

Otro de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la bioactividad de las fracciones peptídicas obtenidas de los hidrolizados de proteína de amaranto una vez sometidas a digestión gastrointestinal. Por lo tanto, se realizó una simulación de la digestión gastrointestinal humana *in vitro* utilizando pepsina, tripsina (T) y quimotripsina (C).

Debido a que T y C son serina proteasas, también se evaluó la actividad los inhibidores de serin proteasas, ya que la A1 y G en su forma nativa contienen el inhibidor de serin proteasas, llamado ATSI, con mayor actividad inhibitoria en la fracción de globulina respecto a A1. Los hidrolizados de ambas proteínas van disminuyendo la actividad inhibitoria a medida que aumenta su tiempo de tratamiento. Como describimos anteriormente se encontró que ambas fracciones en su forma nativa inhiben el 50% de la actividad de serin proteasas. Ahora bien, en estas fracciones se ha purificado en específico un inhibidor denominado ATSI. Esto es relevante porque autores como Hejgaard et al. (1994) observaron que un tratamiento previo de extractos proteicos de amaranto con pepsina, que contienen ATSI, mejoró las actividades proteolíticas de T y C. De manera similar (figuras 23-28) muestran que un tratamiento previo de pH a 4.0 o 7.0 (T = 100 C; t = 1 h) de Alb1H103, Alb1H88, Alb1H24, GloH24 y GloH88 influyeron en la bioactividad luego de una digestión con T y C.

Se encontró que, en general, cuando los hidrolizados se mantuvieron a 100 C por 1 h a pH 4.0, la bioactividad correspondiente resultó en un aumento significativo ($p < 0.05$) ya que los valores de IC_{50} (mg/ml) de ECA disminuyeron de 925 ± 2.2 a 622 ± 0.1 y de 1391 ± 1.4 a 895 ± 0.8 para Alb1H103 y GloH88, respectivamente. El mismo efecto se obtuvo cuando se evaluó AAT ya que sus valores de IC_{50} (mg / ml) produjeron una disminución significativa

($p < 0.05$) de 431.1 ± 0.01 a 226 ± 0.02 y de 12.8 ± 0.06 a 9.4 ± 0.03 para Alb1H103 y GloH88, respectivamente.

Respecto a la AAO por la técnica de DPPH disminuyó ($p < 0.05$) su IC_{50} (mg / ml) de 0.767 ± 0.021 a 0.476 ± 0.037 para Alb1H103 y de 0.435 ± 0.053 a 0.298 ± 0.032 para GloH88; por la técnica de ABTS disminuyó de 0.896 ± 0.074 a 0.432 ± 0.047 para Alb1H88 y de 0.374 ± 0.065 a 0.201 ± 0.038 para GloH88. La AQC disminuyó ($p < 0.05$) su CI_{50} (mg / ml) de 0.973 ± 0.93 a 0.543 ± 0.025 para Alb1H 24 después de la digestión enzimática y de 1.5 ± 0.034 a 0.987 para GloH24. Finalmente, la AQF disminuyó ($p < 0.05$) su CI_{50} (mg / ml) de 0.573 ± 0.065 a 0.345 ± 0.031 para Alb1H103 y de 0.765 ± 0.34 a 0.467 ± 0.026 para GloH24 después de la digestión enzimática.

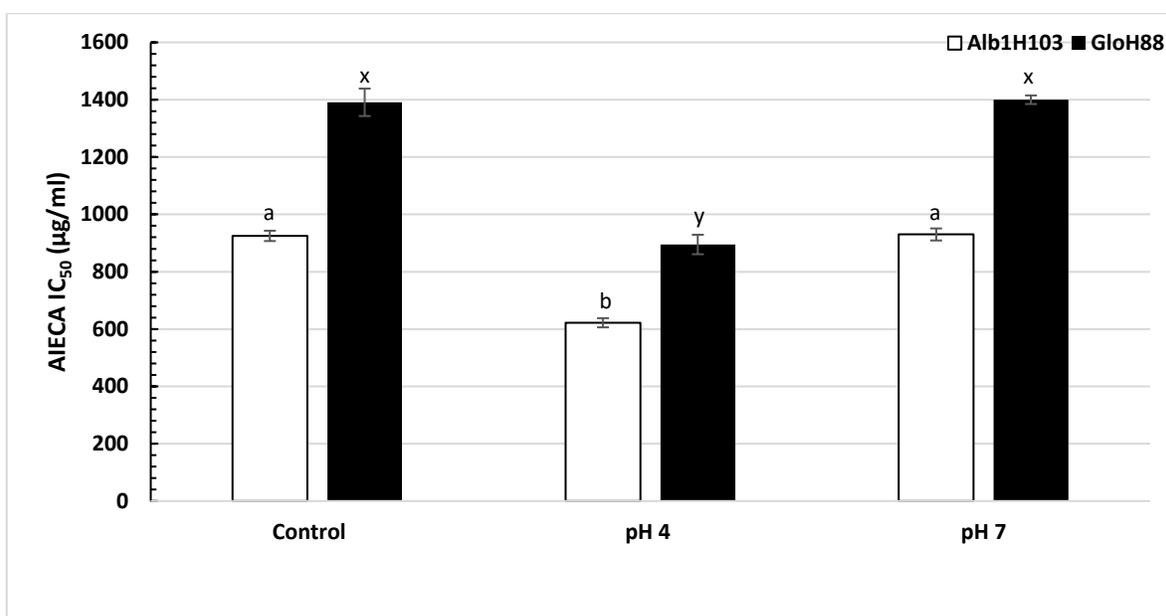


Figura 23. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto con AIECA, seguido de una prueba gastrointestinal *in vitro*.

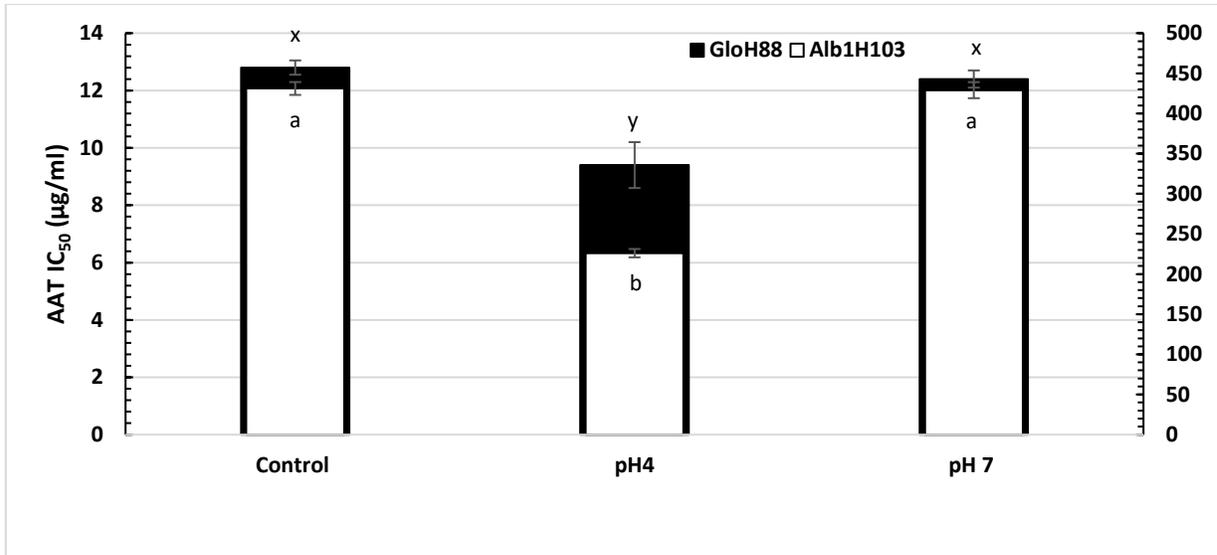


Figura 24. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto con AAT, seguido de una prueba gastrointestinal *in vitro*.

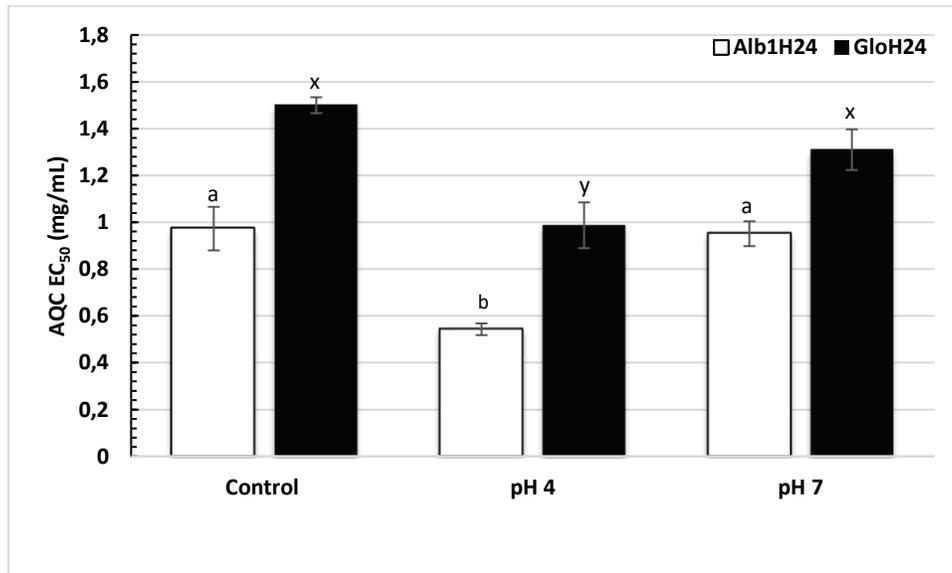


Figura 25. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto con AQC, seguido de una prueba gastrointestinal *in vitro*.

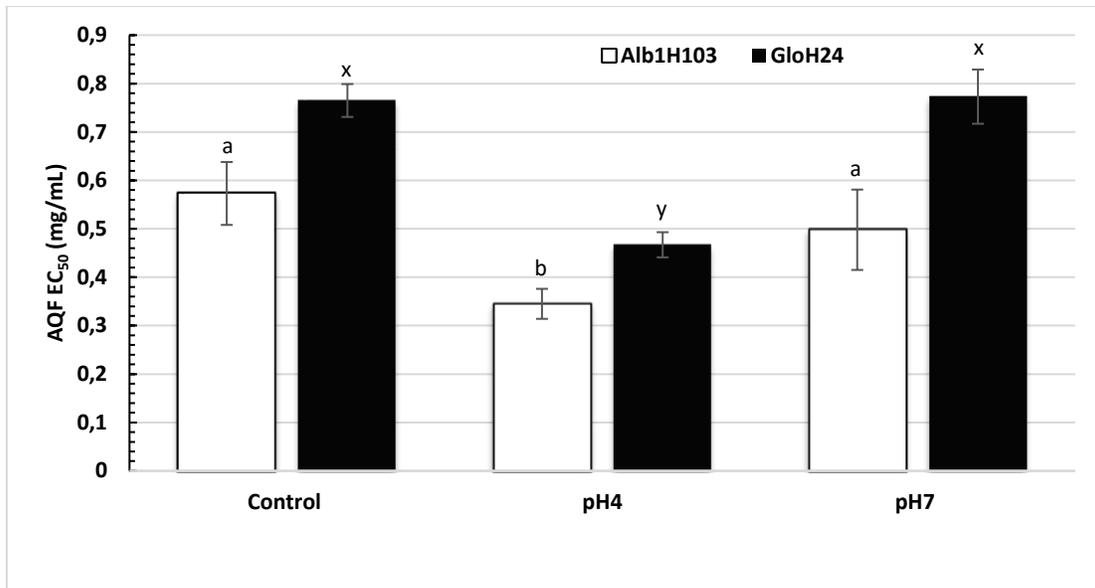


Figura 26. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto con AQF, seguido de una prueba gastrointestinal *in vitro*.

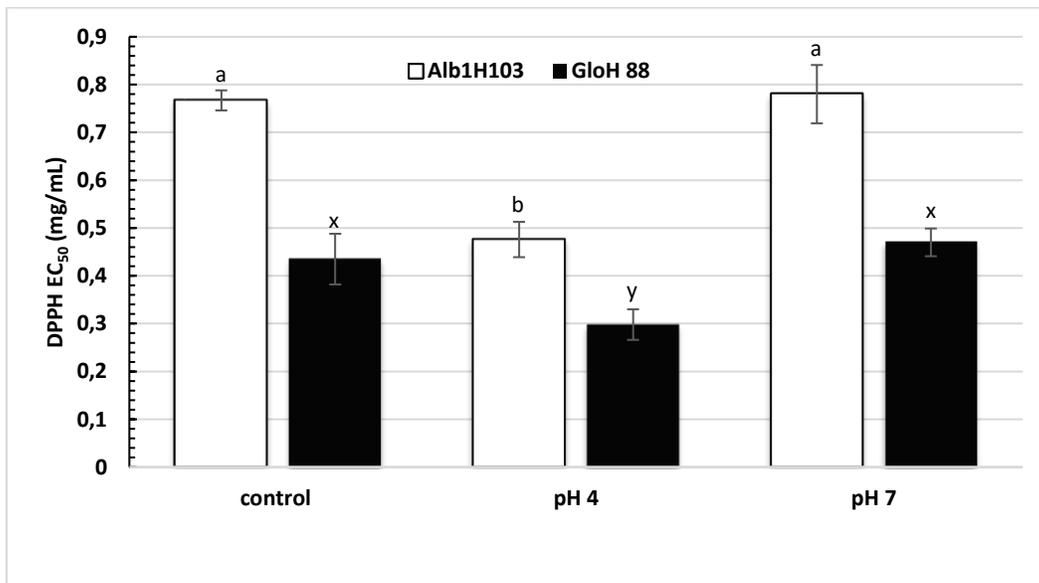


Figura 27. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto con AAO, seguido de una prueba gastrointestinal *in vitro*.

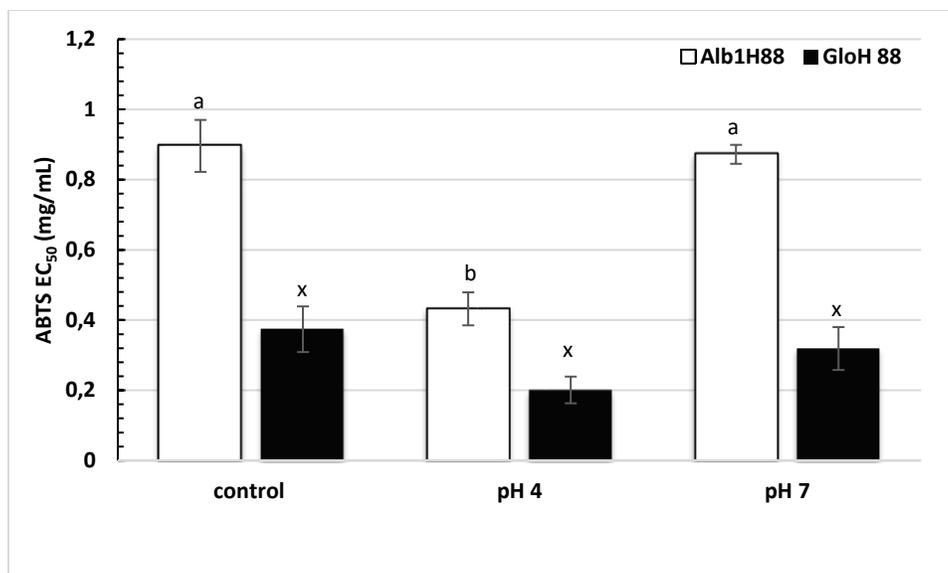


Figura 28. Influencia de un tratamiento previo de pH (4 y 7) de hidrolizados de amaranto con AAO, seguido de una prueba gastrointestinal *in vitro*.

Esta mejora de la actividad inhibidora de la bioactividad correspondiente puede deberse al grado de hidrólisis de los hidrolizados de Alb1H103, Alb1H88, Alb1H24, GloH88 y GloH24 (GH (%) = 42.1 ± 0.4 , 19.43 ± 0.01 , 43.00 ± 0.3 , 22.34 ± 0.89 y 16.3 ± 1.7 , respectivamente). Además, a pH 4.0, se puede promover la hidrólisis de los inhibidores de serin proteasas presentes en las fracciones de A1 y G debido a la actividad de la pepsina. Una vez hidrolizadas las fracciones de A1 y G, no se puede observar inhibición de las serin proteasas (T y C), por lo que estas enzimas continúan hidrolizando péptidos, produciendo así nuevos péptidos con diferentes bioactividades. Los biopéptidos resultantes contenidos en los hidrolizados pueden hidrolizarse por T y C porque estas enzimas pueden escindir enlaces peptídicos específicos, es decir, la pepsina rompe enlaces peptídicos en residuos Tyr, Phe y Leu; tripsina en residuos de Arg y Lys; quimotripsina en residuos Trp, Phe, Tyr, Met y Leu. En cambio, un tratamiento a pH 7.0 de Alb1H103, GloH88 (T = 100 C; t = 1 h) no facilita la hidrólisis de los inhibidores presentes en A1 y G por pepsina y, en consecuencia, la digestión con T y C puede ser inhibida por estas, de forma que los péptidos de cada bioactividad no sufran una hidrólisis adicional. Por tanto, no se observó ninguna diferencia significativa ($p < 0,05$) en las bioactividades de los hidrolizados después de su digestión. Para evitar que la

digestión intestinal altere la estructura química de los biopéptidos, se ha sugerido que los hidrolizados se obtengan utilizando únicamente enzimas proteolíticas digestivas. Sin embargo, la alcalasa es una de las enzimas más buscadas para hidrolizar proteínas de diferentes fuentes.

Orsini et al., (2011) encontraron que los biopéptidos obtenidos de la globulina de grano de amaranto, en una prueba de simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*, no pueden ser escindidos por las enzimas proteolíticas digestivas. Hasta donde sabemos, no hay mucha investigación sobre la estabilidad proteolítica de los péptidos con AIECA con enzimas gastrointestinales. Tavares et al. (2011) encontraron una modesta disminución de AIECA de péptidos de *C. cardunculus*, en el que el $IC_{50} = 336.3 \pm 34.9 \mu\text{g} / \text{ml}$ se redujo a un $IC_{50} = 253.6 \pm 30.7 \mu\text{g} / \text{ml}$, cuando la digestión terminó. Akillioglu y Karakaya (2009) observaron un aumento de la AIECA en hidrolizados de *Phaseolus vulgaris* después de una digestión gastrointestinal. Se obtuvo un tripéptido VAP hidrolizando la proteína de la carpa herbívora con alcalasa y se sometió a digestiones *in vitro* separadas y combinadas con pepsina y quimotripsina, que no mostró ningún impacto de las enzimas digestivas en la AIECA de VAP (Chen et al. 2012). Hwang (2010) observó que la AIECA de los oligopéptidos, obtenidos a partir del jugo de cocción del atún, mostró cambios insignificantes después de una incubación *in vitro* con enzimas gástricas. Esto sugiere que estos oligopéptidos pueden no verse afectados por la digestión en el tracto gastrointestinal. Además, informes anteriores también han demostrado que los péptidos pequeños tienen una baja susceptibilidad a la hidrólisis por las proteasas gástricas. Sheih et al. (2009) sugirieron no solo que los péptidos purificados son resistentes a la digestión en el tracto gastrointestinal, sino también que la secuencia activa del péptido no sería destruida por estas enzimas. Los péptidos de colágeno fueron digeridos por pepsina y pancreatina y proporcionaron un contenido elevado de aminoácidos libres. La AIECA de los péptidos de colágeno se mantuvo estable después de una digestión *in vitro* por proteasas gástricas. Por tanto, los péptidos de colágeno pueden soportar la digestión considerablemente a través del tracto gastrointestinal o pueden degradarse parcialmente en péptidos más pequeños mientras conservan su actividad. Los péptidos de colágeno muestran AIECA potente después de una digestión *in vitro*, posiblemente debido a la hidroxilación postraduccional de prolina en colágeno (Fu et al. 2015). Recientemente en péptidos sintéticos (VL-9) conformado por Lys, Try, Phe Try en el extremo C-terminal, con dos residuos de Pro

demonstró estabilidad frente a una digestión gastrointestinal, se infiere que estos residuos aportan dicha estabilidad (Mirzaei et al., 2020).

Zhang et al. (2015) reporta en que la eliminación de radicales DPPH de péptidos de soja se vieron afectadas por el pretratamiento con pepsina, tipo de tiempo de proteasa e hidrólisis. El pretratamiento con pepsina condujo a un mayor valor de eliminación de radicales DPPH. Se produjo un valor máximo en el tiempo de hidrólisis de 24 h en todos los casos. Los valores más altos de alcalasa y protamex hidrolizados con pretratamiento con pepsina fueron 51.9% y 51.7%, respectivamente (un incremento de 8.0 % y 25.9 %). En presencia del tratamiento con pepsina, las actividades de captación de radicales DPPH de los hidrolizados por protamex fueron básicamente más altas que estas por la alcalasa. Sin embargo, en ausencia de tratamiento con pepsina, la tendencia se revirtió después de la hidrólisis de 24 h. Estos resultados indicaron que el pretratamiento con pepsina podría mejorar las actividades de eliminación de radicales DPPH de hidrolizados de proteína de soja. El tratamiento con pepsina podría ayudar a cambiar la estructura de la proteína de soja y causar la exposición de algunos grupos hidrofóbicos en la parte interna de la proteína (Yuan et al., 2012), mejorando así la eficiencia de la hidrólisis subsiguiente. La hidrólisis adicional por alcalasa y protamex condujo a diversas influencias sobre la capacidad de eliminación de radicales DPPH. Las diferencias pueden ser causadas por las distinciones en las composiciones y secuencias de aminoácidos, el peso molecular y las propiedades físicas de los hidrolizados resultantes. Li et al. (2007) han señalado que el tamaño, la composición de aminoácidos y la hidrofobicidad están estrechamente relacionados con su actividad antioxidante.

Martinez-Palma et al., (2015) evalúan dos muestras de harina de espirulina sometidas a hidrólisis con pepsina y pancreatina la actividad antioxidante y quelante. Reportan un incremento de la actividad antioxidante conforme aumenta el grado de hidrólisis. Por otro lado, los hidrolizados proteicos de ambas muestras mostraron actividad quelante de Fe^{2+} y Cu^{2+} .

Conclusiones

- ✓ Con una relación enzima sustrato de 0.8 UA/g a una temperatura de 50°C, se obtuvieron hidrolizados con actividad AIECA, AAT, AAO, AQC y AQF, así como estabilidad bajo condiciones térmicas, de pH, así como a una simulación gastrointestinal *in vitro*.
- ✓ Las fracciones de AI y G del grano de *A. hypochondriacus* tienen inhibidores de serinproteasas, siendo la fracción de G la que presenta una mayor inhibición. Ambas presentan menor inhibición a la alcalasa en comparación con la tripsina y quimiotripsina.
- ✓ Las actividades: AIECA, AAT, AAO de hidrolizados del grano de amaranto: Alb1H103, Alb1H24, GloH88 y GloH24 presentan estabilidad tanto al tratamiento térmico (40 a 100°C hasta por 2 h) como a pH cercanos a la neutralidad (4.0-8.0).
- ✓ Bajo condiciones fuertemente acidas o alcalinas la actividad quelante de Cu^{2+} se ve afectada con mayor significancia en comparación con la actividad quelante de Fe^{2+} , esto debido a que, bajo estas condiciones, disminuye la probabilidad de formación de quelatos por los aminoácidos.
- ✓ Las actividades: AIECA, AAT, AAO AQC y AQF de los hidrolizados del grano de amaranto presentaron estabilidad después de una simulación gastrointestinal, e incluso aumentan su actividad debida probablemente a la acción de la pepsina,
- ✓ Las bioactividades presentes en los hidrolizados de *Amaranthus hypochondriacus* así como su capacidad y estabilidad están relacionadas con la composición y secuencia aminoacídica, hidrofobicidad, carga neta, aminoácidos terminales y peso molecular de los péptidos generados y en este sentido también dependerán de la enzima o enzimas utilizadas, relación enzima-sustrato, así como el tiempo de hidrólisis.

- ✓ Los hidrolizados analizados en esta de investigación, presentan actividades biológicas de interés para el diseño de alimentos funcionales, además de presentar estabilidad térmica y de pH, con base en estos resultados estos tienen potencial uso en el área de la industria de alimentos como ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales.

Anexos

Curva patrón para la determinación de proteína verdadera

Curva estándar para la determinación de proteína verdadera. Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs. Absorbencia (Figura 29) que se realizó usando como patrón albúmina sérica bovina en concentraciones de 2 a 10 mg/mL.

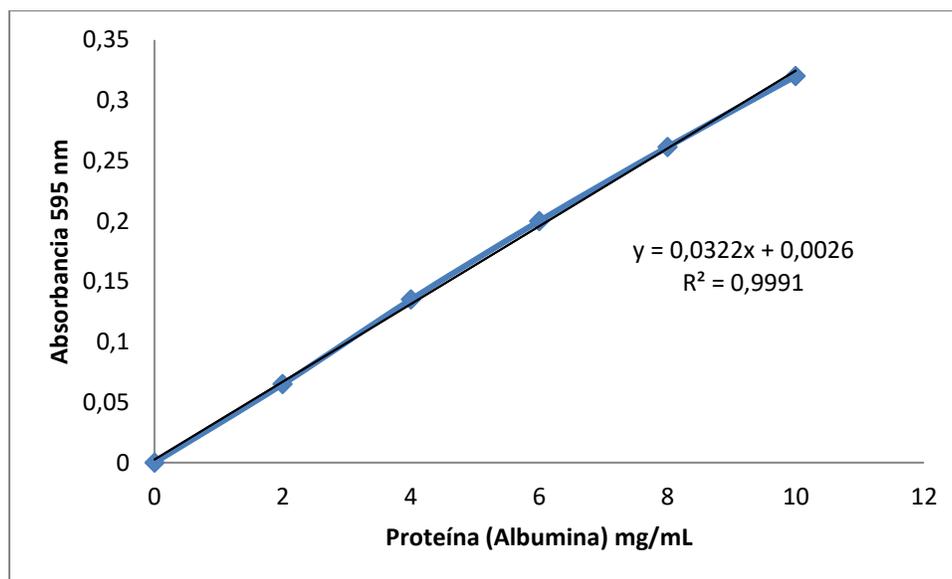


Figura 29. Curva estándar para la determinación de proteína verdadera.

La determinación de la proteína se realizó utilizando la ecuación de la recta que está dada por la curva patrón utilizada.

Curva estándar para la determinación de grupos aminos libres

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs absorbencia (Figura 30) que se realizó usando como patrón leucina en concentraciones de 0.6 a 6 [mM].

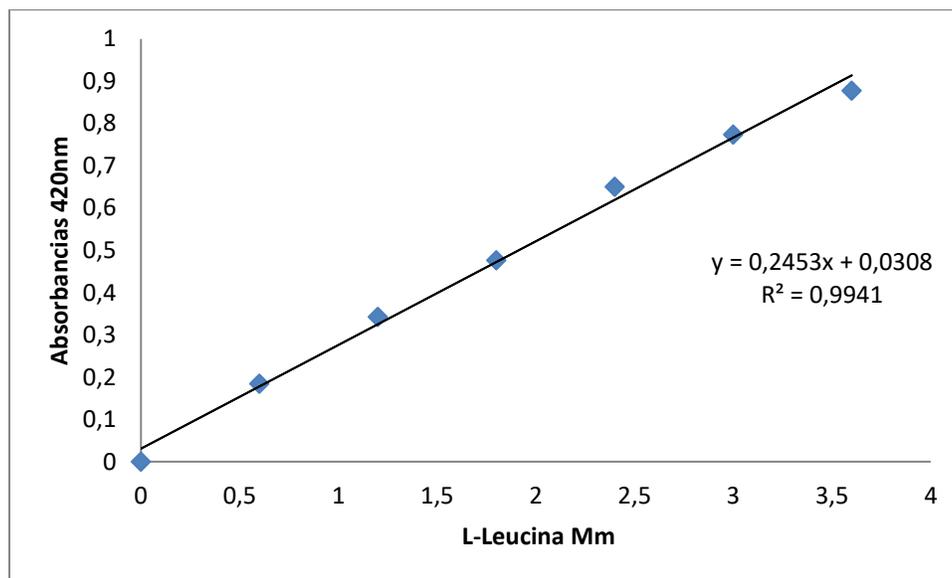


Figura 30. Curva estándar para la determinación de grupos amino libres.

Curva estándar para la determinación de reducción del radical DPPH●

En la figura 31 y 32 se muestran las curvas en equivalentes trolox (mg/L) versus % de inhibición del radical DPPH y ABTS y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la evaluación de la capacidad antioxidante en mg equivalentes de ácido gálico.

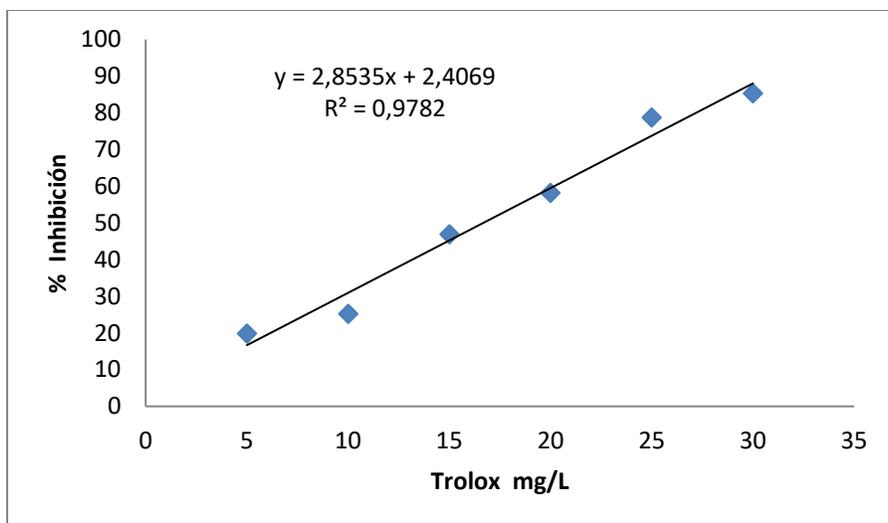


Figura 31. Curva estándar de trolox evaluación de reducción del radical DPPH●

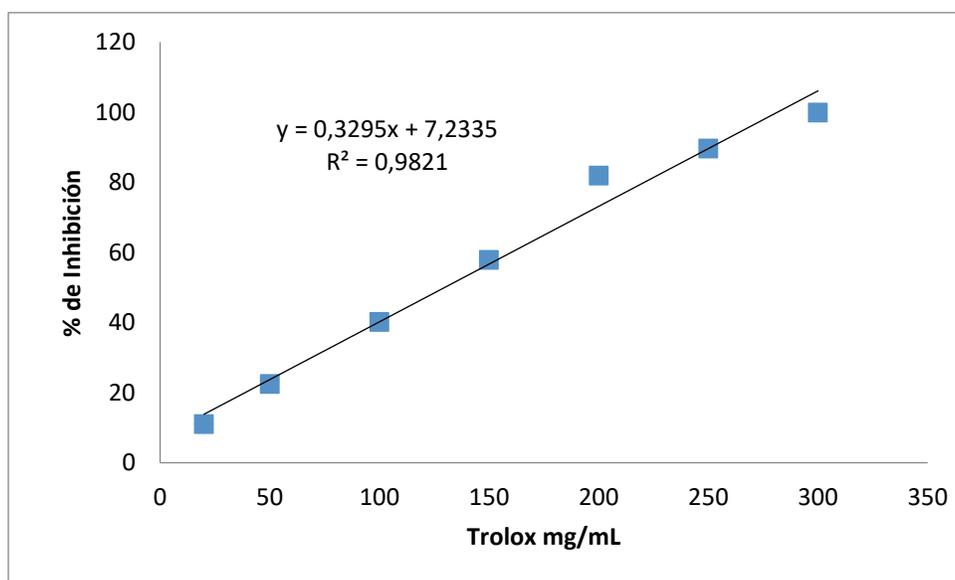


Figura 32. Curva estándar de trolox evaluación de reducción del radical ABTS

Referencias

- Abugoch, L. E. (2006). Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Universidad Nacional de la Plata.
- Abd El-Fattah A. M., Samir Sakr S., Mahmoud El-Dieb S., Satar Elkashef H. A. (2017). Bioactive peptides with ACE-I and antioxidant activity produced from milk proteolysis. *International Journal of Food Properties*, 20 (12): 3033–3042.
- Adler-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1256-1262.
- Adler-Nissen J. (1993). Proteases. In: Nagodawithana T, Reed G, Eds. *Enzymes in food processing*. San Diego (USA): Academic Press; 159-203.
- Akillioglu H, Karakaya S. (2009). Effects of treatment and in vitro digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *Eur Food Res Technol* 229:915–921
- Aleixandre A, Miguel M. y Muguerza B. (2008). Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutr Hosp*. 23 (4): 313-318.
- Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O., & Viroben, G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6): 931–936.
- Barba De la Rosa, AP., Herrera-Estrella, A., Utsumi, S., Paredes-López, O. (1996). Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology*, 149 (5): 527-532.
- Becerril Ramírez A. Evaluación de la Actividad Inhibitoria de Tirosinasa de Hidrolizados Proteínicos del Grano de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). (2017). UNAM. Tesis Licenciatura.

- Benítez R, Ibarz A. y Pagan J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 42 (2): 227-36.
- Berganza, B., Moran, A.W., Rodríguez, G.M., Coto, N.M., Santamaría, M., Bressani, R. (2003). Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 1–6
- Bhat Z.F., Bhat Hina. 2011. Milk and dairy products as functional foods: A review. 6 (1): 1-12.
- Bloom KA, Huang FR, Bencharitiwong R, Bardina L, Ross A, Sampson HA, Nowak-Wegrzyn A. (2015). Effect of heat treatment on milk and egg proteins allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol* 25:740–746.
- Bratovanova, E. K., & Petkov, D. D. (1987). Glycine flanked by hydrophobic bulky amino acid residues as minimal sequence for effective subtilisin catalysis. *The Biochemical Journal*, 248(3), 957–60.
- Rodas, B., Bressani, R. (2009). Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 59, n.1, pp. 82-87
- Bressani, R., & Garcia-Vela, A. L. (1990). Protein Fractions in Amaranth Grain and Their Chemical Characterization. *J. Agric. Food Chem*, 38(5): 1205–1209.
- Bryan, J. (2009) From snake venom to ACE inhibitor – The discovery and rise captopril. *Pharm. J*: 282-455.
- Canabady-Rochelle, L.L.S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F., Girardet, J-M. (2015). Determination of Reducing Power and Metal Chelating Ability of Antioxidant Peptides: Revisited Methods. *Food Chemistry* 1-23
- Carrasco-Castilla J, Hernández-Alvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz M, Girón-Calle J, Vioque J, Dávila-Ortiz G. (2012). Antioxidant and metal

chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem* 135:1789–1795.

- Castellani, O. F., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1998). Structural Modifications of an Amaranth Globulin Induced by pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12): 4846–4853.
- Castellani, O. F., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2000). Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5624–5629
- Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. (2008). Biopéptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud. *Revista salud pública y nutrición*, 9: 2.
- Chen, S., Paredes, O. (1997). Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. *J. Food Biochem*, 21 (6): 53-65.
- Chen J, Wanga Y, Zhong Q, Wua Y, Xiaa W. (2012). Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp Protein. *Peptides*, 33:52–58
- Cian Raúl E., Garzón Antonela G., Ancona David Betancur., Chel Guerrer L., Drago Silvina. (2016). Chelating Properties of Peptides from Red Seaweed *Pyropia columbina* and Its Effect on Iron Bio-Accessibility. *Plant Foods Hum Nutr.* 71:96–101.
- Condés MC, Scilingo AA, Añon MC (2009) Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis: structural and functional changes. *Food Sci Technol*, 42:963–970
- De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Mandoki JJ, Fernández-G JM. (1993). Comparative effect of synthetic amino-estrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids* 58: 407–409.

- Flores-Garcia M, Fernández-G JM, León-Martínez M, Hernández-Ortega S (2012) The structures and inhibitory effects of Buame [N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-butylamine] and Diebud [N,N 0-bis-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-1,4-butanediamine] on platelet aggregation. *Steroids* 77:512–520
- Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Añón MC (2011) Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem* 126:878–884.
- Fu Y, Young JF, Dalsgaard TK, Therkildsen M (2015) Separation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine connective tissue and their stability towards temperature, pH and digestive enzymes. *Int J Food Sci Technol* 50:1234–1243
- Gallegos-Tintoré Santiago, Torres-Fuentes Cristina, Martínez-Ayala Alma Leticia, Solorza-Feria Javier, Alaiz Manuel, Girón-Calle Julio y Vioque Javier. 2011. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. *J Sci Food Agric.*, 91: 1618-1624.
- Guadix A, Guadix E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello P. y Camacho F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41 (1): 79-89.
- González G, Alvarado-Vasquez N, Fernández-G JM, Cruz-Robles D, del Valle L, Pinzón E, Torres I, Rodríguez E, Zapata E, Gómez-Vidales V, Montaña LF, de la Peña A (2010) The antithrombotic effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17B-YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 208: 62–68

- Gorinstein, S., Zemser, M., Friedman, M., Rodrigues, W. A., Martins, P. S., Vello, N. A., Paredes-López, O. (1996). Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins. *Food Chemistry*, 56(2): 131–138.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Fliess, A., Shnitman, I., Paredes-Lopez, O., Yamamoto, K., Taniguchi, H. (1998). Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62(10): 1845–51.
- Hayakari M, Kondo Y, Izumi H (1978) A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal Biochem* 84:361–369.
- Hejgaard, J. Dam J, Petersen LC, Bjorn SE (1994) Primary structure and specificity of the major serine proteinase inhibitor of amaranth (*Amaranthus caudatus L.*) seeds. *Biochim Biophys Acta* 1204:68–74.
- Hwang JS. (2010). Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. *Food Res Int* 43: 902–906.
- Ifeoluwa Adegbola, P. Adetutu, A. Olaniyi, T. (2020). Antioxidant activity of *Amaranthus* species from the *Amaranthaceae* family – A review. *South African Journal of Botany*, 133:111-117.
- Jang, H.L. Liceaga, A.M. Yoon, K. Y. (2016). Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 20: 433-442.
- Kapla, B. (2000). Gel Electrophoresis in Protein and Peptide Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Doi:10.1002/9780470027318.a1613
- Kamath, V, Niketh, S, Chandrashekar, A, Rajini, S. P. 2007. Chymotryptic Hydrolysates of a Kafrin, the Storage Protein of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Exhibited Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Chemistry*, 100: 306-311.

- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J., & Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains growing c4 plant that produces high yields of amaranth grains. A large amount of proteins method. *Agric. Biol. Chem.*, 55(11): 2745–2750
- Li, G. H. Le, G.W., H. y Shi, Y.H. 2005. Mung-bean Protein Hydrolysates Obtained with Alacalse Exhibit Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food of Science Technology International*. 11: 282-287.
- Li, Y., Jiang B., Zhang, T., W., Liu J. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106: 444-450.
- Li Hao., Xinchang Gao., Tingyi Zhou., Jinxuan Cao., Yangying Sun., Yali Dang., Daodong Pan. (2020). Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Antioxidant Activity of Umami Peptides after In Vitro Gastrointestinal Digestion. *J. Agric. Food Chem*, 68, 31: 8232–8241.
- Luo, Y.; Pan, K.; Zhong, Q. (2014). Physical, Chemical and Biochemical Properties of Casein Hydrolyzed by Three Proteases: Partial Characterizations. *Food Chemistry*, 155: 146–155.
- Lu, S., Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R., Gu, X., Pongor, S. (1999). Solution structure of the major α -amylase inhibitor of the crop plant amaranth. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20473–20478.
- Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth proteins isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.*, 44(9), 2523–2530.
- Martínez, E. N., Castellani, O. F., & Añón, M. C. (1997). Common Molecular Features among Amaranth Storage Proteins. *Scanning*, 3832–3839.
- Martínez-Palma, N.; Martínez-Ayala, A.; Dávila-Ortiz, G. (2015). Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*arthrospira*

maxima) obtained by simulated gastrointestinal digestion Revista Mexicana de Ingeniería Química, (14 (1): 25-34.

- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998). Salt soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. Food Chemistry, 63(2), 265–274.
- Marcone, M. F., & Kakuda, Y. (1999). A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. Nahrung - Food, 43(6), 368–373.
- Marcone, M. F. (2000). First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(2), 378–382.
- Medrano M, Ortega B. (1994). Caracterización de cuatro ecotipos de *Amaranthus caudatus* kiwicha a través del análisis bromatológico, fraccionamiento proteico y electroforético. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad N. Lima, Perú.
- Mendoza-Figueroa J.S., Kvarnheden A., Méndez-Lozano J., Rodríguez-Negrete E.A., Arreguín-Espinosa de los Monteros R., Soriano-García M. (2018). A peptide derived from enzymatic digestion of globulins from amaranth shows strong affinity binding to the replication origin of Tomato yellow leaf curl virus reducing viral replication in *Nicotina benthamiana*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 145: 56-65.
- Meisel H. 2001. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. Australian Journal of Dairy Technology. 56: 83-91.
- Mulero Cánovas J, Pilar Zafrilla Rentero, Adela Martínez-Cachá Martínez, Mariano Leal Hernández y José Abellán Alemán. (2011). Péptidos bioactivos. Clin Invest Arterioscl, 23(5):219-227.
- Montoya-Rodríguez A, Gómez-Favela MA, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, González de Mejía E (2015) Identification of bioactive peptide sequences from

amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Compr Rev Food Sci Saf*, 14:139–156.

- Nardo A. E. Péptidos Bioactivos de Globulinas de Amaranto. Una Aproximación Computacional y Experimental. 2017. Tesis Doctoral.
- Orsini DMC, Tironi VA, Añón MC (2011) Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Sci Technol* 44(1752):1760.
- Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins. *Journal of the Society of Chemical Industry* (2nd editio, Vol. 43). London: John Wiley & Sons, Ltd.
- Patel, P. Borchard, R. (1990). Chemical Pathways of Peptide Degradation. III. Effect of Primary Sequence on the Pathways of Deamidation of Asparaginyl Residues in Hexapeptides. *Pharmaceutical Research*, (7): 787–793.
- Paredes Ruíz F.M.H. (2013). Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa de hidrolizados proteínicos del grano de amaranto (*Amaranthus Hypochondriacus L.*). UAM. Tesis Licenciatura.
- Pihlanto A, Korhonen H. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Adv Food Nut Res*. 47: 175—276.
- Pihlanto-Leppala A. 2000. *Trends Food Sci Technol*, 11:347-56.
- Quiroga, A. V, Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2007). Amaranth Globulin Polypeptide Heterogeneity. *The Protein Journal*, 26(5): 327–333.
- Raina A, Datta A. Molecular cloning of a gene encoding a seed specific protein with nutritional and balanced aminoacid composition from *Amaranthus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;80: 11774-8.
- Rao S, Sun J, Liu Y, Zeng H, Su Y, Yan Y (2012) ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Chem* 135:1245–1252.

- Rui X (2012) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Res Int* 49:739–746.
- Rui L., Jianming CH., Hao W. (2019). Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. *Int.J. Mol. Sci*, 20 (3): 463
- Sabione AC, Scilingo A, Añón MC (2015) Potential antithrombotic in amaranth proteins and its hydrolysates. *Food Sci Technol*, 60:171–177.
- Sabbione, A. C., Ibañez, S. M., Martínez, E. N., Añón, M. C., & Scilingo, A. A. (2016). Antithrombotic and Antioxidant Activity of *Amaranth* Hydrolysate Obtained by Activation of an Endogenous Protease. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(2): 174–182.
- Sabbione, A. C., Rinaldi, G., Añón, M. C., & Scilingo, A. A. (2016). Antithrombotic Effects of *Amaranthus hypochondriacus* Proteins in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1): 19–27.
- Sánchez-del Pino, I. Vrijdaghs, A. De Vlock, P. Flores, H. (2019). Floral development in Gomphrenoideae (*Amaranthaceae*) with a focus on androecial tube and appendages. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 190(3):315-332.
- Salnikow, J., Zemser, M., Gorinstein, S., Friedman, M., Scheler, C., & Paredes-Lopez, O. (1998). Structure-Function Relationships of Folded and Unfolded Amaranth Proteins. *Protein Journal*, 17(6): 543-567.
- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A., & Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. In O. Paredes-López (Ed.), *Amaranth. Biology, chemistry and technology* pp 129–185).
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L. E., Rodriguez-Nester, C. E., & Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization of

amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9): 1553–1558.

- Sheih IC, Fang TJ, Wub TK. (2009). Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem*, 115:279–284.
- Silke Hutschenreiter, Lars Neumann, Ulf Rädler, Lutz Schmitt, and Robert Tampe. (2003). Metal-Chelating Amino Acids As Building Blocks For Synthetic Receptors Sensing Metal Ions And Histidine-Tagged Proteins. *ChemBioChem* 2003, 4, 1340-1344.
- Soriano-Santos J, Escalona-Buendía HB. (2015). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. *J Food Sci Technol*, 52:2073–2082
- Tavares T, Contreras M, Amorim M, Pintado M. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: *In vitro* effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32:1013–1019.
- Torres- Fuentes C., Alaiz M., Vioque J. 2014. Chickpea chelating peptides inhibit copper-mediated lipid peroxidation. *J. Sci Food Agric*. 94: 3181-3188.
- Tovar-Pérez EG, Guerrero-Legarreta I, Farrés-González AN, Soriano-Santos J (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chem*, 116:437–444.
- Valdes-Rodriguez S, Segura Nieto M, Chagolla-Lopez A, Verver-y Vargas-Cortina A, Martinez-Gallardo N, Blanco-Labra A (1993) Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol*, 103:1407–1412.

- Villanueva, O., Arnao, I. 2007. Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (kiwicha). *An Fac Med Lima*; 68:4, 344 – 350.
- Vioque Javier y Millán Francisco. 2001. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevas gentes promotores de la salud. AgroCSIC.
- Wu J, Ding X (2002) Characterization of inhibition and stability of soy protein derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int* 35:367–375.
- Wu W, Feng-yang Z, Hong-xia CH, Zhan-mei J (2014) Stability and cytotoxicity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein. *J Zhejiang Univ-Sci B*, 2:143–152.
- Whitaker JR. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker.
- Yamamoto Naoyuki, Masahiro Ejiri and Seiichi Mizuno. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *current pharmaceutical design*. Bentham Science Publishers, 9:1345-1355.
- Yang Y., Marczak D. E., Yokoo M., Usui H., Yoshikawa M. 2003. Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin I- Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4897-4902.
- You, L., Zheng, L., Regenstein, J.M., Zhao, M., Liu D. (2012). Effect of thermal treatment on the characteristic properties of loach peptide. *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (12), 1-8.
- S.-Y. Tsai, H.-L.Tsai, and J.-L. Mau. 2007. “Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*,” *LWT—Food Science and Technology*, vol. 40, no. 8, pp. 1392– 1402.

- K. Slinkard and V. L. Singleton. 1997. "Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49–55.
- Zarei M., Ghanbari R., Tajabadi N., Abdul-Hamid A., Abu Bakar F., Saari N. (2016). Generation, fractionation, and characterization of iron-quelating protein hydrolysate from Palm Kernel Cake proteins. *Journal of Food Science*, 81 (2), 341-347.



EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE PROCESAMIENTO Y DE UNA DIGESTIÓN IN VITRO SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE *Amaranthus hypochondriacus* L.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 4 del mes de agosto del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
- DRA. MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ
- DR. RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO
- DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: JENNIFER LOPEZSANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JENNIFER LOPEZSANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL

DRA. MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ

VOCAL

DR. RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO

SECRETARIO

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA