

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada



**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE QUINUA CON ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE Y SU EFECTO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO  
ASOCIADO A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**



**MIGUEL LÓPEZ MORENO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

(CSIC-UAM)

Madrid 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada

**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE QUINUA CON ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE Y SU EFECTO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO  
ASOCIADO A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

Memoria presentada por:

**Miguel López Moreno**

Para optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**



**Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dra. Marta Miguel Castro**

**Dra. Marta Garcés Rimón**

## **Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación**

**MARTA MIGUEL CASTRO, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y MARTA GARCÉS RIMÓN, INVESTIGADORA Y PROFESORA DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA**

### **HACEN CONSTAR:**

Que el presente trabajo titulado “Obtención de hidrolizado de quinua con actividad antioxidante y su efecto sobre el estrés oxidativo asociado a la hipertensión”, que constituye la Memoria que presenta el graduado Miguel López Moreno para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioactividad y Análisis de los Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Madrid, 30 de Mayo de 2022

Marta Miguel Castro

Marta Garcés Rimón

*Se entiende por serendipia como un hallazgo valioso que se produce de manera accidental y casual. Esta etapa ha deparado en mi camino personas únicas, sin las cuáles no hubiera sido capaz de finalizar este viaje, o al menos a terminarlo ileso.*

*En primer lugar, tengo que agradecer a mis dos guías, Marta Miguel y Marta Garcés. A ti Marta M por confiar en aquel chaval que apareció de la nada, por todos los aprendizajes profesionales y personales, y sobre todo, por enseñarme a creer en mi. A ti Marta Garcés, gracias por ser la jefa que todos queríamos tener, por transmitirme esa pasión en todo lo que haces y por estar ahí cuando lo necesitaba. Esto es solo el comienzo, bueno, siempre y cuando queráis seguir aguantándome.*

*Me gustaría agradecer al CIAL por la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en sus instalaciones. Desde la actual directora, M. Mar Villamiel, como la anterior directora, Tiziana Fornari, pasando por Macarena, Julia, Fernando, Cristina S., Josefina y un largo etcétera de grandes profesionales que realizan una labor incansable y hacen del CIAL un centro de investigación de referencia. También al grupo BIOPEP, a todas sus investigadoras e integrantes. A todos los que estuvieron desde el comienzo: Leti, Marta, David, Verónica, Alba, Mónica; Leti, gracias por tus chistes, las risas y esos momentos del café; Marta, gracias por tu inestimable ayuda; David, gracias por tu serenidad y estar ahí para todo lo que fuera necesario ¿quién nos iba a decir que volveríamos a coincidir?; Verónica, gracias por ser como eres y todas las risas que nos hemos echado; Alba, gracias por tener siempre una sonrisa y por todos esos ratitos en el labo; Mónica, gracias por soportarme, tus consejos, tu pasión por lo que haces y todas esas conversaciones durante la cuarentena. También a los que llegaron más recientemente; Pablo, gracias por ese humor tan tuyo; Sara, gracias por aguantar mis bromas y tonterías.*

*Agradecer a la universidad Rey Juan Carlos por la oportunidad de realizar parte de mi tesis doctoral en sus instalaciones. En especial, gracias a Gema V., Antonio U. y Davinia por su ayuda incondicional, aprendizajes y echarme una mano en todo lo que he necesitado. Del mismo modo, me gustaría agradecer a la Universidad Francisco de Vitoria por abrirme sus puertas para llevar cabo parte de mi trabajo y por ofrecerme la posibilidad*

*de formar parte de su grupo de docentes. En especial, a Maite Iglesias por ayudarme en todo lo que necesitaba y contar conmigo para proyectos e investigaciones, eres un ejemplo y fuente de inspiración para mi.*

*Un agradecimiento especial a todas las personas que han pasado por el grupo Bioactive Gastronomy. En primer lugar, a Silvia y Bea F por recibirme en el grupo y tratarme como uno más desde el inicio. También agradecer a los que os quedáis: Luis, Lolo, Estefanía y Eva; Luis, a pesar de que no hemos coincidido mucho, gracias por tu predisposición y ayuda en todo lo que he necesitado; Lolo, gracias por tus canciones, bailes y risas; Estefanía, gracias por echarme una mano y hacer posible que termine esta tesis doctoral; Eva, mi confidente, amiga y la persona que más me ha soportado en toda esta etapa, el destino estaba empeñado en que volviéramos a coincidir.*

*A todo el equipo de Training Boutique: Javi C, Javi P, Carlos P, Carlos L, Jaime, Carmen y Héctor. A ti Javi: gracias por leer ese e-mail y confiar en mi, por tu comprensión y motivación por seguir creciendo, sin ti no estaría aquí. A todos los integrantes de Training Boutique: gracias por permitirme formar parte de un equipo de profesionales y personas únicas y sobre todo por todos esos fines. A los más nuevos: Carmen, gracias por tu humor, el buen rollo y pasión que transmites en todo lo que haces; Jaime, gracias por ser como eres y demostrarme lo que es ser un amigo.*

*A todos mis amigos: Jorge, Félix, Carlos S, Carlos D, Roberto, José y Javi. Por hacer que, a pesar de la distancia y el tiempo, cada vez que vuelvo a casa todo siga igual y nada haya cambiado. Por todos esos planes, experiencias y momentos únicos vividos desde que éramos unos críos hasta ahora.*

*En especial, a toda mi familia por aguantar mi malafollá cuando no estaba de humor, por apoyarme en todas mis decisiones y hacer posible que me encuentre cumpliendo mis sueños. A mi madre, por mover cielo y tierra para darme todo lo que he necesitado. A mi padre, por estar ahí cuando lo necesitaba y enseñarme que nada es tan importante. A mi hermana, gracias por demostrarme lo que es ser una hermana. Gracias por estar ahí.*

*Os quiero.*

*“Sobre todo, no temas a los momentos difíciles.  
Lo mejor viene de ellos”*

*-Rita Levi-Montalcini*

# Índice

---

<b>Resumen/abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1.Introducción.....</b>	<b>14</b>
1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles. Enfermedad cardiovascular .....	14
1.2. Hipertensión arterial .....	18
1.2.1.Hipertensión arterial y estrés oxidativo .....	20
1.2.2.Tratamiento de la hipertensión arterial.....	22
1.2.3.Hipertensión arterial y terapia antioxidante.....	27
1.3. Modelos experimentales para el estudio del estrés oxidativo y de la hipertensión arterial ..	29
1.3.1.Saccharomyces cerevisiae BY4741 como organismo modelo para evaluar la actividad antioxidante in vivo .....	29
1.3.2.Modelos murinos para el estudio de la HTA.....	30
1.4. Alimentos e ingredientes funcionales.....	32
1.4.1.Hidrolizados de proteínas alimentarias y péptidos bioactivos.....	38
1.4.2.La quinua como alimento funcional .....	40
1.4.3.Hidrolizados de proteínas y péptidos bioactivos derivados de quinua .....	44
<b>2.Hipótesis y Objetivo .....</b>	<b>46</b>
<b>3.Material y Métodos .....</b>	<b>47</b>
3.1.Obtención de hidrolizados de quinua .....	48
3.2.Análisis sensorial básico.....	51
3.3.Determinación de la capacidad antioxidante in vitro .....	51
3.3.1. Determinación de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).....	51
3.3.2. Determinación de los compuestos fenólicos totales. FOLIN-CIOCALTEU .....	54
3.4.Estudio de la capacidad antioxidante in vivo del hidrolizado de quinua.....	55
3.4.1. Protocolo general del estudio en Saccharomyces cerevisiae BY4741 .....	55
3.4.2. Medios de cultivo e inducción de estrés oxidante .....	57
3.4.3. Determinación de parámetros relativos a las curvas de crecimiento.....	58
3.4.4. Recuento de viables.....	59
3.5.Efecto del hidrolizado de quinua en un modelo experimental de HTA.....	60
3.5.2. Seguimiento y evaluación del peso corporal e ingestas .....	63
3.5.3. Estudio de neuropatía diabética. Método de los filamentos de Von Frey .....	63
3.5.4. Medida de la presión arterial .....	65

3.5.5. Finalización del estudio y toma de muestras para análisis .....	66
3.5.6. Homogeneización de tejidos.....	66
3.5.7. Evaluación de la capacidad antioxidante del plasma y tejidos .....	67
3.5.8. Determinación del glutatión reducido en hígado.....	67
3.5.9. Determinación de malondialdehído en plasma y tejidos.....	68
3.6. Análisis estadístico .....	69
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>70</b>
4.1. Obtención y selección de hidrolizados de quinua. Análisis sensorial y actividad biológica in vitro .....	71
4.2. Evaluación de la actividad antioxidante in vivo del hidrolizado de proteínas de quinua roja en un organismo modelo. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 .....	85
4.3. Efecto del consumo de hidrolizados de quinua en un modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas.....	90
4.3.1. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja sobre la ingesta y la composición corporal.....	91
4.3.2. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja sobre el desarrollo de neuropatía periférica.....	98
4.3.3. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas.....	101
4.3.4. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en biomarcadores de estrés oxidativo en ratas espontáneamente hipertensas .....	105
4.3.4.1. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la capacidad antioxidante del plasma.....	105
4.3.4.2. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la capacidad antioxidante del hígado, corazón, aorta y riñón .....	107
4.3.4.3. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en los niveles de glutatión reducido del hígado .....	110
4.3.4.4. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la peroxidación lipídica del plasma.....	112
4.3.4.5. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la peroxidación lipídica del hígado, corazón, aorta y riñón .....	115
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>119</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>122</b>



## Resumen/abstract

El **objetivo global** de esta Tesis Doctoral fue la obtención y desarrollo de hidrolizados de proteínas derivados de quinua con actividad antioxidante *in vitro* y con buen perfil sensorial, y evaluar el efecto beneficioso que ocasiona su administración frente al estrés oxidativo y/o sobre el desarrollo de hipertensión arterial (HTA) en modelos *in vivo*, así como investigar los posibles mecanismos de acción implicados en su actividad biológica.

La primera parte del trabajo consistió en la obtención de hidrolizados de quinua de tres variedades distintas: blanca, roja y negra, empleando diferentes enzimas de grado alimentario. Con el fin de seleccionar el hidrolizado más prometedor tanto a nivel biológico como sensorial se llevó a cabo, en primer lugar, una evaluación sensorial básica para descartar aquellos hidrolizados que presentaran atributos extraños o desagradables. En paralelo a la evaluación sensorial, se evaluó en cada uno de los hidrolizados la actividad antioxidante *in vitro*, determinada por su capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés: *Oxygen radical absorbance capacity*), y se cuantificaron los polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. En relación a los resultados obtenidos tras la evaluación sensorial de los hidrolizados, aquellos obtenidos con las proteasas Promod 279P, Flavorpro 373MDP, Flavorpro 750MDP y Alcalasa 2.4 LFG mostraron los resultados más prometedores, mientras que el resto de proteasas empleadas mostraron un perfil sensorial desagradable, principalmente relacionado con el sabor y el olor, incluso a tiempos cortos de hidrólisis. En concreto, el hidrolizado de quinua roja producido con Alcalasa 2.4 LFG con una duración aproximada de entre 1 y 4 horas fue el más prometedor, teniendo en cuenta los aspectos sensoriales básicos analizados, y presentó sabores agradables con notas dulces y olores neutros.

Los resultados de la medida de la actividad antioxidante *in vitro* mostraron que, entre las diferentes variedades de quinua hidrolizadas y a tiempos de hidrólisis inferiores a las 6 horas (momento en el que el perfil sensorial se ve afectado de manera negativa), los hidrolizados que mostraron los mejores resultados fueron los obtenidos con las enzimas Alcalasa 2.4 LFG y Flavorpro 373MDP en un rango de 432,1 y 2204,3  $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína y, de forma general, fueron los hidrolizados de quinua blanca los que presentaron una actividad antioxidante más baja tras la hidrólisis enzimática, cuando se compararon con

los hidrolizados de quinua roja y negra. En el caso de la determinación del contenido de compuestos fenólicos, se observó un descenso gradual de estos compuestos conforme transcurría el proceso de hidrólisis. De las diferentes variedades, la quinua negra mostró un contenido de compuestos fenólicos superior y, en concreto, los valores más altos se encontraron en la quinua negra sin hidrolizar, que llegó a alcanzar 81 mg Equivalentes de Ácido Gálico (GAE)/100 g de quinua. Estos resultados sugieren que el incremento en la actividad antioxidante que se produce en los hidrolizados obtenidos a partir de las diferentes variedades de quinua, no parece estar relacionado con el contenido de compuestos fenólicos, sino más bien con la liberación de otros compuestos con potencial antioxidante, como es el caso de los péptidos bioactivos.

Tras llevar a cabo la evaluación sensorial y analizar la actividad antioxidante *in vitro* de los diferentes hidrolizados de quinua desarrollados, se seleccionó finalmente el hidrolizado de quinua roja producido con Alcalasa 2.4 LFG durante 2 horas, por presentar de forma simultánea un elevado potencial antioxidante ( $1118,4 \pm 17,9$   $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) y un óptimo perfil sensorial. En este hidrolizado se evaluó a continuación la actividad antioxidante *in vivo* utilizando como organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. En este estudio se puso a prueba la capacidad de diferentes dosis del hidrolizado de quinua seleccionado (1  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$ ) para inhibir el estrés oxidativo provocado en la célula mediante la incorporación de un agente oxidante (peróxido de hidrógeno). Se evaluaron para ello la tasa de crecimiento, la capacidad de carga y el recuento de viables, y se comparó el efecto del hidrolizado de quinua respecto al ocasionado por el grupo control sin tratamiento y con agente oxidante, y respecto a otros antioxidantes de referencia como la vitamina C y el resveratrol. La administración del hidrolizado de quinua roja con alcalasa en el estudio realizado en *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 ocasionó una mayor capacidad de carga y recuento de viables respecto al grupo control con tratamiento oxidante, al grupo suplementado con vitamina C y al grupo suplementado con resveratrol. Los resultados obtenidos en este modelo experimental corroboraron *in vivo* las propiedades antioxidantes del hidrolizado de quinua roja seleccionado que se habían descrito previamente en los ensayos *in vitro*. Esto es importante ya que la biodisponibilidad, reactividad y estabilidad de un determinado compuesto *in vivo*, puede modificarse con respecto a la capacidad antioxidante observada *in vitro*.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió investigar si las propiedades antioxidantes del hidrolizado seleccionado podrían mitigar el estrés oxidativo asociado a la enfermedad cardiovascular y, concretamente, si podrían mejorar la HTA y sus complicaciones asociadas. Para ello, se evaluó el efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja con alcalasa en un modelo animal de HTA de origen genético, como es la rata SHR (por sus siglas en inglés: *Spontaneously Hypertensive Rat*), y en su control normotenso, la rata Wistar Kyoto (WKY, por sus siglas en inglés: *Wistar Kyoto*). Las ratas SHR se dividieron en 4 grupos de 8 animales cada uno a los que se administró: hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día), vitamina C (250 mg/kg/día) o agua corriente filtrada sin tratamiento antioxidante. Las ratas WKY se dividieron en 3 grupos de 8 animales a los que se administró: hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), vitamina C (250 mg/kg/día) o agua corriente filtrada sin tratamiento antioxidante. Durante las 8 semanas de duración del estudio se registraron semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida. También se evaluó la presencia o desarrollo de neuropatía periférica (sensibilidad mecánica) mediante el método de los filamentos de *Von Frey* en la semana inicial, en la semana 6 y al finalizar el estudio. Además, tanto al inicio como al finalizar el periodo experimental se midió la presión arterial sistólica (PAS) de los animales mediante el método no invasivo basado en una modificación de la técnica de manguito en la cola. Transcurridas las 8 semanas de estudio, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de sangre, de diferentes tejidos de interés (corazón, hígado, riñón, aorta, cerebro, bazo, pulmón, músculo, tejido adiposo epididimal y tibia) de los que se registró su peso, y de las heces. Con la finalidad de realizar distintos ensayos para intentar dilucidar los posibles mecanismos de acción implicados en el efecto del hidrolizado de quinua en este modelo experimental, se determinó la capacidad antioxidante y los niveles de malonildialdehído (MDA) en plasma, hígado, corazón, aorta y riñón. Además, en el caso del hígado se examinó la concentración de glutatión reducido. Los resultados se contrastaron con los obtenidos en el grupo control sin tratamiento antioxidante y tras la administración de vitamina C, y también se evaluó y comparó el efecto de los distintos tratamientos con los obtenidos en sus controles normotensos, las ratas WKY.

En el estudio realizado en ratas, se observó que el consumo del hidrolizado de quinua roja con alcalasa, tanto en ratas WKY como SHR, provocó una ingesta líquida significativamente superior a la de sus respectivos grupos control. Estos resultados podrían

explicarse por las características organolépticas del hidrolizado de quinua roja seleccionado que favoreció una mayor ingesta líquida al resultar más palatable. En el caso de los pesos relativos de los distintos tejidos investigados, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, a excepción del hígado. En este sentido se observó que el grupo de ratas SHR tratadas con la dosis más alta del hidrolizado de quinua roja con alcalasa (1000 mg/kg/día) presentó un peso relativo de dicho órgano inferior respecto a su grupo control. Estas diferencias sugieren que el consumo de hidrolizado de quinua roja podría atenuar los cambios estructurales y/o funcionales que ocurren en este tejido y que están asociados al desarrollo de la HTA.

Además, tanto en las ratas WKY como en las ratas SHR, la administración del hidrolizado de quinua roja con alcalasa logró atenuar el desarrollo de alodinia mecánica que sí se observó en el grupo tratado con vitamina C y en el grupo control. De esta manera, se evidencia el potencial del hidrolizado de quinua roja con alcalasa para mitigar el desarrollo de neuropatía periférica, tanto en los estadios iniciales de la enfermedad (pre-hipertensión), como una vez instaurada la HTA.

En relación a la medida indirecta de presión arterial, la administración del hidrolizado de quinua roja con alcalasa ocasionó una reducción significativa de la PAS en ratas SHR tratadas con 1000 mg/kg/día respecto a sus valores iniciales ( $-9,8 \pm 4,5$  mmHg). En cambio, no se constataron diferencias significativas en los valores de la PAS en el resto de grupos experimentales de ratas SHR, entre los que se observó sin embargo un ligero aumento de esta variable a lo largo del estudio. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos de ratas WKY, lo que pone de manifiesto que el efecto antihipertensivo del hidrolizado de quinua roja con alcalasa es propio de la condición de HTA.

Los resultados obtenidos sobre el estudio de biomarcadores de estrés oxidativo mostraron, que el consumo de 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa en ratas SHR, ocasionó un aumento de la capacidad antioxidante del riñón respecto al resto de grupos experimentales. Estos resultados sugieren que la administración del hidrolizado de quinua roja con alcalasa podría suponer una mejora en el mecanismo de defensa frente a las posibles alteraciones a nivel renal ocasionadas por el estrés oxidativo vinculado a la

HTA. Estas diferencias no se observaron en el plasma ni en el resto de tejidos analizados (hígado, corazón y aorta).

Los niveles de glutatión reducido en el hígado disminuyeron de forma significativa en las ratas SHR control con respecto a su control normotenso, lo que pone de manifiesto las implicaciones de este compuesto antioxidante en el origen y desarrollo del HTA. Asimismo, la administración del hidrolizado de quinua roja con alcalasa en una dosis de 1000 mg/kg/día provocó un incremento de los niveles de glutatión reducido en este tejido comparado con el grupo de ratas SHR control. Por tanto, el consumo del hidrolizado de quinua roja con alcalasa, por su carácter antioxidante y en una dosis suficiente, podría inducir un aumento en la biosíntesis de glutatión reducido, un marcador esencial de la defensa antioxidante intracelular y clave en el desarrollo de HTA.

Del mismo modo, en las ratas SHR el consumo del hidrolizado de quinua roja con alcalasa en una dosis de 1000 mg/kg/día, disminuyó significativamente los niveles de MDA en plasma y riñón respecto al grupo control, mejorando así los niveles de peroxidación lipídica en estos animales. Estos hallazgos observados en el plasma podrían explicarse, al menos en parte, por el aumento de la actividad antioxidante a nivel plasmático observado en el grupo tratado con el hidrolizado de quinua roja con alcalasa en una dosis de 1000 mg/kg/día que, aunque sin diferencias significativas respecto al grupo control de ratas SHR, la tendencia observada pone de manifiesto la posibilidad de que esta vía estuviera involucrada en la inhibición de la peroxidación lipídica en el plasma. En el caso del corazón, la administración de las dos dosis de hidrolizado de quinua roja con alcalasa empleadas (250 mg/kg/día y 1000 mg/kg/día), y también la administración de vitamina C ocasionaron una disminución de los niveles de MDA en ratas SHR respecto al grupo control. La reducción de la peroxidación lipídica reportada en el corazón tras la administración del hidrolizado de quinua roja con alcalasa podría relacionarse con la reducción de la presión arterial observada en este estudio, si tenemos en consideración que los pacientes hipertensos suelen manifestar comúnmente un incremento de los niveles de MDA a nivel sistémico.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han demostrado el efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* del hidrolizado de quinua roja con Alcalasa 2.4 LFG y su

capacidad para mejorar la HTA y sus complicaciones asociadas. En el momento actual continuamos esta línea de investigación para profundizar en el mecanismo de acción de este hidrolizado mediante la realización de estudios histológicos, análisis de otros biomarcadores, estudios de expresión génica y expresión proteica y análisis de la microbiota intestinal. Por último, este trabajo abre la puerta a otros estudios experimentales con hidrolizados de quinua que permitan, en última instancia, que estos productos lleguen a comercializarse como ingredientes funcionales en alimentos o bebidas que mejoren las distintas patologías relacionadas con el estrés oxidativo como la HTA. Para ello, serán necesarios estudios de intervención que demuestren su eficacia y seguridad en humanos.

## ABSTRACT

The overall objective of this Doctoral Thesis was to obtain and develop quinoa-derived protein hydrolysates with *in vitro* antioxidant activity and a good sensory profile, and to evaluate the beneficial effect of their administration against oxidative stress and/or the development of hypertension using *in vivo*, as well as to investigate the possible mechanisms of action involved in their biological activity.

The first part of the work consisted of obtaining quinoa hydrolysates from three different varieties: white, red and black, using different food-grade enzymes. In order to select the most promising hydrolysate according to its biological and sensory properties, a basic sensory evaluation was first performed to discard those hydrolysates that presented strange or unpleasant attributes. In parallel to the sensory evaluation, the *in vitro* antioxidant activity of each hydrolysate was evaluated by the Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and total polyphenols were quantified using the Folin-Ciocalteu method. Regarding the results obtained after sensory evaluation of the hydrolysates, those obtained with the proteases Promod 279P, Flavorpro 373MDP, Flavorpro 750MDP and Alcalase 2.4 LFG showed the most promising results, while the rest of the enzymes used showed an unpleasant sensory profile, mainly related to taste and odor, even at short hydrolysis times. In particular, the red quinoa hydrolysate produced with Alcalase 2.4 LFG with a duration of about 1 to 4 hours was the most promising, considering the basic sensory aspects analysed, and presented pleasant flavors with sweet notes and neutral odors.

The results of the *in vitro* antioxidant activity showed that, among the hydrolysates from different varieties of quinoa and at hydrolysis times of less than 6 hours (at which time the sensory profile is negatively affected), the hydrolysates that showed the best results were those obtained with the enzymes Alcalase 2.4 LFG and Flavorpro 373MDP in a range of 432.1 and 2204.3  $\mu\text{mol ET/g protein}$  and, in general, the white quinoa hydrolysates showed the lowest antioxidant activity after enzymatic hydrolysis compared to red and black quinoa hydrolysates. In the case of the determination of the content of phenolic compounds, a gradual decrease of these compounds was observed in the progression of hydrolysis process. Of the different varieties, black quinoa showed a higher content of phenolic compounds and, in particular, the highest values were found in the non-hydrolysed black quinoa, which

reached 81 mg Gallic Acid Equivalents (GAE)/100g of quinoa. These results suggest that the increase in antioxidant activity produced in the hydrolysates obtained from the different quinoa varieties does not seem to be related to the content of phenolic compounds, but to the release of other compounds with antioxidant potential, such as bioactive peptides.

After performing the sensory evaluation and analysing the *in vitro* antioxidant activity of the different quinoa hydrolysates developed, the red quinoa after 2 hours of hydrolysis with Alcalase 2.4 LFG was finally selected, as it simultaneously presented a high antioxidant potential ( $1118.4 \pm 17.9 \mu\text{mol ET/g protein}$ ) and an optimal sensory profile. The *in vivo* antioxidant activity of this hydrolysate was then evaluated *in vivo* using *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 as a model organism. In this study, the ability of different doses of the selected quinoa hydrolysate (1  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  and 20  $\mu\text{L}$ ) to inhibit oxidative stress in the cells by incorporation of an oxidising agent (hydrogen peroxide) was tested. The growth rate, loading capacity and viable count were evaluated and the effect of the quinoa hydrolysate was compared with the untreated control group, with oxidising agent, and with reference antioxidants such as vitamin C and resveratrol. The administration of red quinoa hydrolysate with alcalase in the study performed on *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, resulted in a higher loading capacity and viable count compared to the control group with oxidant treatment, the group supplemented with vitamin C and the group supplemented with resveratrol. The results obtained in this experimental model corroborated *in vivo* the antioxidant properties of the selected red quinoa hydrolysate previously described in the *in vitro* assays. This is important since the bioavailability, reactivity and stability of a given compound *in vivo* can be modified with respect to the antioxidant capacity observed *in vitro*.

In view of these results, it was decided to investigate whether the antioxidant properties of the selected hydrolysate could improve the oxidative stress associated with cardiovascular disease and, specifically, whether it could improve HTN and its associated complications. To this end, the effect of the consumption of red quinoa hydrolysate with alcalase was evaluated in an animal model of genetic hypertension, the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR), and in its normotensive control, the Wistar Kyoto (WKY) rat. The SHR rats were divided into 4 groups of 8 animals each that were administered: red quinoa hydrolysate (1000 mg/kg/day), red quinoa hydrolysate (250 mg/kg/day), vitamin C (250 mg/kg/day) or filtered tap water without antioxidant treatment. The WKY rats were divided into 3 groups of 8 animals and administered either red quinoa hydrolysate (1000 mg/kg/day), vitamin C (250



mg/kg/day) or filtered tap water without antioxidant treatment. During the 8 weeks of the study, different parameters such as body weight, solid intake and liquid intake were recorded weekly. The presence or development of peripheral neuropathy (mechanical sensitivity) was also assessed using the Von Frey filament method at baseline, at week 6 and at the end of the study. In addition, both at baseline and at the end of the experimental period, the systolic blood pressure (SBP) of the animals was measured using the non-invasive method based on a modification of the tail-cuff technique. After 8 weeks of study, the animals were sacrificed and samples of blood, different tissues of interest (heart, liver, kidney, aorta, brain, spleen, lung, muscle, epididymal adipose tissue and tibia) whose weight was recorded, and faeces were taken. In order to perform different tests to try to elucidate the possible mechanisms of action involved in the effect of the quinoa hydrolysate in this experimental model, the antioxidant capacity and the malondialdehyde (MDA) levels in plasma, liver, heart, aorta and kidney were determined. In addition, the concentration of reduced glutathione in the liver was examined. The results were compared with those obtained in the control group without antioxidant treatment and after vitamin C administration, and the effect of the different treatments was also evaluated and compared with those obtained in their normotensive controls, the WKY rats.

In the study carried out in rats, it was observed that consumption of red quinoa hydrolysate with alcalase, in both WKY and SHR rats, led to a significantly higher liquid intake than in their respective control groups. These results could be explained by the organoleptic characteristics of the selected red quinoa hydrolysate, which favored a higher liquid intake as it was more palatable. In the case of the relative weights of the different organs analysed, no significant differences were observed between the different experimental groups, with the exception of the liver. In this regard, it was observed that the group of SHR rats treated with the highest dose of red quinoa hydrolysate with alcalase (1000 mg/kg/day) presented a lower relative weight of this organ compared to the control group. These significant differences observed in relative liver weight in SHR rats suggest the ability of red quinoa hydrolysate to attenuate the structural and/or functional changes in this tissue that are associated with the development of HTN.

Furthermore, in both WKY and SHR rats, the administration of red quinoa hydrolysate with alcalase attenuated the development of mechanical allodynia that was observed in the vitamin C-treated and control groups. This demonstrates the potential of quinoa hydrolysate

with alcalase to mitigate the development of peripheral neuropathy, both in the initial stages of the disease (pre-hypertension) and after the onset of hypertension.

In relation to the indirect measurement of blood pressure, the administration of red quinoa hydrolysate caused a significant reduction in SBP in SHR rats treated with 1000 mg/kg/day with respect to their initial values ( $-9.8 \pm 4.5$  mmHg). In contrast, there were no significant differences in SBP between the different experimental groups of SHR rats, among which a slight increase in SBP was observed throughout the study. There were also no significant differences between any of the groups of WKY rats, demonstrating that the antihypertensive effect of red quinoa hydrolysate with alcalase is specific to the hypertensive condition.

The results obtained from the study of biomarkers of oxidative stress showed that the consumption of 1000 mg/kg/day of red quinoa hydrolysate with alcalase in SHR rats led to an increase in the antioxidant capacity of the kidney compared to the rest of the experimental groups. These results suggest that the administration of red quinoa hydrolysed with alcalase could improve the mechanism of defense against possible alterations at the renal level caused by oxidative stress linked to hypertension. These differences were not observed in plasma or in the other tissues analysed (liver, heart and aorta).

The levels of reduced glutathione in the liver were significantly decreased in the control SHR rats compared to their normotensive control, highlighting the implications of this antioxidant compound in the origin and development of hypertension. Furthermore, administration of red quinoa hydrolysate with alcalase at a dose of 1000 mg/kg/day resulted in increased levels of reduced glutathione in this tissue compared to the control SHR group. Therefore, the consumption of red quinoa hydrolysate with alcalase, due to its antioxidant character and at a sufficient dose, could induce an increase in the biosynthesis of reduced glutathione, an essential marker of intracellular antioxidant defense and a key factor in the development of hypertension.

Similarly, in SHR rats, the consumption of red quinoa hydrolysed with alcalase at a dose of 1000 mg/kg/day significantly decreased MDA levels in plasma and kidney compared to the control group, thus improving lipid peroxidation levels in these animals. The findings

observed in plasma could be explained, at least in part, by the increased antioxidant activity at plasma level observed in the group treated with the red quinoa hydrolysate at a dose of 1000 mg/kg/day which, although not significantly different from the control group of SHR rats, the trend observed highlights the possibility that this pathway was involved in the inhibition of lipid peroxidation in plasma. In the case of the heart, administration of the two doses of alcalase-containing red quinoa hydrolysate used (250 mg/kg/day and 1000 mg/kg/day), as well as vitamin C, resulted in a decrease in malondialdehyde levels compared to the control group of SHR rats. The reduction in lipid peroxidation recorded in the heart after administration of red quinoa hydrolysate could be related to the reduction in blood pressure observed in this study, considering that hypertensive patients usually manifest increased levels of MDA at the systemic level.

Overall, the results obtained in this Doctoral Thesis have demonstrated the *in vitro* and *in vivo* antioxidant effect of the red quinoa hydrolysate with Alcalase 2.4 LFG and its ability to ameliorate hypertension and its associated complications. We are currently focus on this line of research to further investigate the mechanism of action of this hydrolysate by performing histological studies, analysis of other biomarkers, gene expression and protein expression studies, and analyzing the intestinal microbiota. Finally, this work opens the door to other experimental studies with quinoa hydrolysates that will ultimately allow these products to be marketed as functional ingredients in foods or beverages that improve various pathologies related to oxidative stress such as hypertension. This will require intervention studies to demonstrate their efficacy and safety in humans.

## **1. Introducción**

### **1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles. Enfermedad cardiovascular**

La sociedad actual está abordando un reto de salud debido al alarmante aumento de la incidencia de Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT) con sus consiguientes consecuencias sobre la calidad de vida de la población que las padece (NCD Countdown 2030 Collaborators, 2018). Las ECNT son una condición médica o enfermedad considerada no infecciosa con largos períodos de latencia y con una lenta progresión, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares (ECV), el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. De las diferentes ECNT, las ECV constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2019 fallecieron 17,7 millones de personas en el mundo debido a las ECV, lo que supone un 32% de todas las muertes registradas (WHO, 2021). De mantenerse la tendencia actual se espera que para 2030 más de 22,2 millones de personas fallezcan debido a esta condición (Şahin & İlğün, 2020). Según la OMS, las ECV están compuestas por una serie de afecciones del corazón y de los vasos sanguíneos, entre las que podemos distinguir: enfermedades coronarias, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatías reumáticas, cardiopatías congénitas y trombosis venosas. De los diferentes tipos de ECV, según la fisiopatología y la zona afectada, destaca la enfermedad coronaria, ocasionada por la arterioesclerosis de las arterias coronarias y responsable de casi la mitad de la muertes asociadas a las patologías cardíacas (Roth et al., 2020). Otra de las alteraciones cardiovasculares más frecuentes es la enfermedad cerebrovascular, caracterizada por la oclusión del flujo sanguíneo hacia el cerebro. En la mayoría de los casos, esta patología es de naturaleza isquémica y está ocasionada por la obstrucción de una arteria que dificulta el paso de la sangre a una determinada parte del cerebro. Cuando esta oclusión se origina por un coágulo de sangre desarrollado en los vasos sanguíneos localizados en el cerebro, se denomina trombótica, mientras que cuando el coágulo tiene otro origen, y se desplaza a través del torrente sanguíneo hasta el cerebro se denomina embólica. En el caso de que se produzca una ruptura de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro, se denomina enfermedad cerebrovascular de naturaleza hemorrágica (Campbell et al., 2019).

Las ECV se consideran además una condición multifactorial, donde la coexistencia de diferentes factores de riesgo, muchos de los cuáles modificables, incrementa la susceptibilidad al desarrollo de la misma. Algunos de los diferentes factores de riesgo modificables son la hipertensión arterial (HTA), la hiperglucemia, la hipercolesterolemia, la obesidad o el consumo de tabaco (Roth et al., 2020). De entre ellos, la HTA se ha constatado como el factor modificable más importante, ya que supone el 33% y el 45,2% de la proporción de riesgo atribuible poblacional de ECV y enfermedad cerebrovascular, respectivamente (O'Donnell et al., 2010; Ruiz-Hernandez et al., 2018). Cabe destacar que la mayoría de estos factores de riesgo son prevenibles con un estilo de vida saludable, por lo que el incremento de la incidencia de ECV puede entenderse de forma paralela a la adopción de hábitos perjudiciales para salud. Las guías dietéticas para la prevención de ECV de la mayoría de países recomiendan un incremento de la ingesta de alimentos vegetales no procesados, reemplazar las grasas saturadas por monoinsaturadas y poliinsaturadas, además de reducir el consumo de azúcar y de sal (Nestel et al., 2021). Este patrón dietético se ve representado en la dieta mediterránea y en la dieta DASH (de sus siglas en inglés “Dietary Approaches to Stop Hypertension”), de las que hablaremos con más detalle en el apartado 1.2.2, y que han evidenciado de forma consistente un efecto protector sobre el riesgo de padecer alguna enfermedad de tipo cardiovascular (Chareonrungrueangchai et al., 2020).

Se sabe además que las ECV tienen profundas consecuencias sobre la calidad de vida. Este impacto puede calcularse a través de un indicador sintético de salud utilizado para medir la carga de enfermedad a nivel poblacional, conocido como Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD). Este valor indica el número de años perdidos debido a enfermedad, discapacidad o muerte prematura. Fue desarrollado en la década de 1990 como una forma de comparar la salud en general y la esperanza de vida de diferentes países (Murray & Acharya, 1997). Tal es la relevancia de las ECNT que son responsables del 60% de los AVAD a nivel global, de los cuáles un 25% son atribuibles a las ECV (Masaebi et al., 2021).

Entre los componentes alimentarios vinculados tradicionalmente con el riesgo de desarrollar ECV destacan las grasas, en concreto las grasas saturadas y grasas trans (Wang et al., 2016). Recientemente la organización Cochrane ha publicado un meta-análisis de ensayos controlados aleatorizados que puso de manifiesto cómo la reducción del consumo de grasas saturadas durante al menos 2 años, se vinculaba con una disminución del 21% del riesgo de sufrir eventos cardiovasculares (Hooper et al., 2020). Estos hallazgos están en

consonancia con trabajos previos que han evidenciado como cuando se sustituye un 5% de la energía procedente de las grasas saturadas por grasas poliinsaturadas, se disminuye la concentración de colesterol LDL en 10 mg/dl, y del índice colesterol total/colesterol HDL en 0,16 mg/dl, factores también asociados al riesgo cardiovascular (Mozaffarian et al., 2010). En el caso de las grasas trans se ha observado un aumento del 23% del riesgo de ECV por cada incremento en un 2% de la energía diaria total procedente de este tipo de grasas (Miller et al., 2022).

En los últimos años, el azúcar incorporado de forma exógena a los alimentos, conocido como azúcar añadido, se ha asociado también con el riesgo de desarrollar distintas ECNT. En lo que respecta a las ECV, diferentes estudios han descrito el impacto perjudicial del consumo elevado de azúcar. Yang et al. (2014) evidenciaron que el riesgo de mortalidad por ECV puede llegar a duplicarse cuando el consumo de azúcares libres supone más del 21% de la ingesta energética total diaria. De forma general, el azúcar libre lo encontramos en alimentos altamente procesados, conocidos como ultraprocesados, que de acuerdo al sistema de clasificación NOVA se caracterizan con frecuencia por su baja calidad nutricional y por poseer a su vez un elevado aporte en grasas, principalmente saturadas, y sodio (Monteiro et al., 2019; Srour et al., 2019). En la cohorte Framingham se observó como por cada ración de alimentos ultraprocesados se producía un aumento del 9% en el riesgo de mortalidad por ECV (Filippa et al., 2021).

Por otro lado, también se ha sugerido que el consumo de sodio, principalmente en forma de cloruro sódico (sal común), contribuye a aumentar el riesgo de desarrollar ECV. En este sentido, la OMS recomienda un consumo de sal inferior a 5 g/día como estrategia efectiva para la disminución de HTA y por ende de las patologías asociadas a la misma (WHO, 2020). La ingesta excesiva de sal ocasiona cambios funcionales y estructurales a nivel renal, lo que puede desencadenar una alteración del sistema renina angiotensina aldosterona involucrado en la homeostasis del sodio y de la presión arterial (He et al., 2020). Un meta-análisis demostró que los individuos con una elevada ingesta de sodio presentaron un 19% más de riesgo de sufrir alguna enfermedad cardiovascular (Wang et al., 2020). Del mismo modo, en ese mismo trabajo se observó una relación dosis-respuesta, y es que el riesgo de desarrollar ECV aumentaba un 6% por cada incremento en 1 g/día del consumo de sodio. Así, las intervenciones basadas en reducir el consumo de sodio en la dieta han demostrado ser de

utilidad clínica en la reducción de la presión arterial y, por tanto, de uno de los factores de riesgo cardiovascular más relevantes como es la HTA (Graudal & Jurgens, 2020).

Diferentes investigaciones han evidenciado los beneficios de seguir un patrón de dieta mediterránea sobre la salud cardiovascular, tanto en la prevención como en el abordaje dietético de las diferentes ECV (Delarue, 2021; Tang et al., 2021). Tal es la relevancia de esta dieta que, en 2010, fue declarada Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad por la UNESCO (de sus siglas en inglés: *United Nations, Educational, Scientific and Cultural Organization*) (Saulle & La Torre, 2010). La dieta mediterránea se caracteriza por el consumo de alimentos de origen vegetal mínimamente procesados, frescos y de temporada, el uso de aceite de oliva y de frutos secos como principales fuentes de grasa dietética, la ingesta de lácteos, huevos y pescado en cantidades moderadas (Guasch-Ferré & Willett, 2021). Recientemente, el estudio PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea), realizado en personas con alto riesgo cardiovascular, ha puesto de manifiesto la utilidad de la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen o nueces sobre la prevención primaria de ECV (Estruch et al., 2018). En concreto, la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen o nueces provocó una reducción del riesgo de accidente cerebrovascular en un 35% y un 46%, respectivamente. Sin embargo, no se observó un menor riesgo de infarto de miocardio o muerte por ECV. Esta ausencia de beneficios en desenlaces finales de las ECV podría ser debido a la composición de la alimentación dentro de un patrón concreto de dieta mediterránea. De hecho, un análisis post-hoc de la cohorte PREDIMED observó cómo aquellos participantes con un mayor consumo de alimentos de origen vegetal mostraron una reducción del riesgo de mortalidad en todas las causas (Martínez-González et al., 2014). De forma similar, en un estudio longitudinal realizado en población adventista (corriente religiosa de origen americano que se caracteriza entre otras cosas por desarrollar un estilo de vida saludable, promoviendo activamente el ejercicio físico, el vegetarianismo y la abstinencia del alcohol y de tabaco), se evaluó el potencial efecto sobre la salud del consumo de proteína según su origen fuera animal o vegetal. Tras realizar un seguimiento de su estilo de vida durante 10 años, Tharrey et al., (2018) demostraron que el consumo de proteínas de origen animal procedente de carne se asociaba con un incremento del 61% de la mortalidad por ECV mientras que el consumo de proteínas de origen vegetal, procedentes de semillas y frutos secos se vinculó con una reducción del 40% en dicha condición.

Los resultados de estas investigaciones resaltan la importancia del consumo de alimentos de origen vegetal, de tal forma que una dieta basada en plantas o que incluya abundantes alimentos de origen vegetal, se postula de gran utilidad en la prevención y abordaje terapéutico de las ECV (Toh et al., 2020). En este contexto, los estudios de intercambio isocalórico han supuesto un gran avance en el conocimiento del potencial beneficio que puede ocasionar el consumo de un alimento concreto, ya que consideran el efecto que supone reemplazar un determinado alimento por otro distinto. Así, se ha señalado que por cada ración de carne roja que se reemplaza por legumbres o proteínas de origen vegetal se produce una reducción del riesgo de enfermedad coronaria del 17% y del 13%, respectivamente (Al-Shaar et al., 2020).

La evidencia científica anteriormente mencionada, procedente tanto de estudios epidemiológicos como de estudios clínicos, pone de manifiesto como los factores dietéticos desempeñan un papel determinante en el riesgo de desarrollar ECV, y especialmente en el caso del desarrollo y aparición de HTA.

## **1.2. Hipertensión arterial**

La presión arterial se define como la fuerza que ejerce la sangre que bombea el corazón sobre la pared arterial. Cuando se produce un aumento sostenido de los valores normales de la presión arterial, se desencadena una condición patológica que podría llegar a causar HTA. La Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) publicaron en 2018 la Guía Europea ESC/ESH 2018 sobre el Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, en la que se establecieron los criterios de cribado acorde a los valores medidos en mm Hg de la presión arterial sistólica (PAS) y de la presión arterial diastólica (PAD). En la tabla 1 se observan los rangos establecidos para el diagnóstico de los diferentes estadios de HTA. De acuerdo a estos criterios, para el diagnóstico de la HTA los valores de PAS tienen que ser superiores a 140 mm Hg y/o los de PAD mayores de 90 mm Hg (ESC & ESH, 2019). Tal es la relevancia de este factor de riesgo, que cada incremento de 20 mm Hg de la PAS y de 10 mm Hg de PAD se ha asociado con el doble de riesgo de sufrir cardiopatías, enfermedades cerebrovasculares y otras patologías vasculares (Arnett et al., 2019).



**Tabla 1:** Clasificación de la hipertensión arterial según la Guía Europea SEH/SEC de 2018.

Categoría	PAS (mm Hg)		PAD (mm Hg)
<b>Óptima</b>	<120	y	<80
<b>Normal</b>	120-129	y/o	80-84
<b>Normal-alta</b>	130-139	y/o	85-89
<b>HTA de grado 1</b>	140-159	y/o	90-99
<b>HTA de grado 2</b>	160-179	y/o	100-109
<b>HTA de grado 3</b>	≥180	y/o	≥110
<b>HTA sistólica aislada *</b>	≥140	y	<90

\*La hipertensión sistólica aislada debe clasificarse en grados (1,2,3) según las cifras de presión arterial sistólica en los rangos indicados. PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; SEC: Sociedad Europea de Cardiología; SEH: Sociedad Europea de Hipertensión, HTA: Hipertensión arterial.

La etiología de la HTA puede dividirse en dos categorías: *HTA primaria o esencial* y *HTA secundaria*. La HTA primaria es la más prevalente ya que la padecen el 90-95% de los pacientes diagnosticados en clínica (Oparil et al., 2018). Este tipo de HTA presenta un origen multifactorial basado en la interacción entre factores ambientales y diferentes genes susceptibles que no han sido completamente dilucidados. Entre estos factores de riesgo se encuentran determinantes genéticos no modificables como la edad, el género o la raza, además de factores ambientales identificados y modificables como son: la dieta con un alto contenido en sodio, grasa, colesterol y azúcares libres, el consumo de tabaco y/o de alcohol, el sedentarismo y el estrés, entre otros (Unger et al., 2020). Por otro lado, la HTA secundaria tiene una etiología conocida, presenta una menor prevalencia y la padece un bajo número de pacientes hipertensos (5-15%) (Rimoldi et al., 2014). Entre las causas más comunes de HTA secundaria podemos destacar: patologías renales, apnea obstructiva del sueño, patologías renovasculares como la enfermedad renovascular aterosclerótica o alteraciones endocrinas como el aldosteronismo primario o la enfermedad tiroidea. Además, se han identificado factores genéticos asociados a este tipo de HTA y, en concreto, trastornos monogénicos que provocan un aumento de la reabsorción de sodio en el túbulo renal (ESC & ESH, 2019).

La HTA habitualmente concurre junto a otros factores de riesgo de ECV, como la diabetes, la dislipidemia o la hiperuricemia. Se estima que más del 50% de los pacientes hipertensos presentan uno o varios factores de riesgo cardiovascular adicionales (Unger et al., 2020). El sistema de Evaluación Sistemática del Riesgo Coronario (SCORE, por sus

siglas en inglés: *Systematic Coronary Risk Evaluation*) es un algoritmo que permite evaluar el riesgo de sufrir un primer evento coronario mortal en 10 años, según los diferentes factores de riesgo como son el sexo, la edad, la concentración de colesterol total, los valores de PAS y el tabaquismo (Conroy et al., 2003). Sin embargo, la validez de este sistema está limitada a individuos con un rango de edad comprendido entre los 40 y los 65 años. Por ello, posteriormente se desarrolló una extensión a este algoritmo conocido como sistema de Evaluación Sistemática del Riesgo Coronario en Adultos Mayores (SCORE O.P, por sus siglas en inglés: *Systematic Coronary Risk Evaluation Older Persons*) para la estimación del riesgo en población mayor de 65 años (Cooney et al., 2016). Para ello, los coeficientes y ponderaciones utilizados referentes a cada uno de los factores de riesgo se realizan en base a una cohorte restringida a dicho rango de edad. De acuerdo al score O.P se estima que hasta un 22.9% de los adultos españoles mayores de 64 años sin antecedentes de diabetes mellitus o ECV presentarían riesgo alto o muy alto de mortalidad cardiovascular (Brotons et al., 2016).

### 1.2.1. Hipertensión arterial y estrés oxidativo

En el organismo existe un equilibrio oxidación-reducción esencial para los seres vivos, conocido como *equilibrio redox*, en el que las especies oxidativas son contrarrestadas rápidamente mediante los mecanismos de defensa antioxidante. Por un lado, a través de las reacciones oxidativas que tienen lugar en la cadena de transporte de electrones mitocondrial se producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (EROs) como son: radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La generación de EROs puede proceder también de la actividad de diferentes enzimas como la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa o la xantina oxidasa. Diferentes procesos fisiológicos como la activación de factores transcripción, la apoptosis, el estatus inmunitario y las reacciones de fosforilación de proteínas, son dependientes de unos adecuados niveles de EROs (Rajendran et al., 2014). Por otro lado, los sistemas antioxidantes actúan contrarrestando el efecto de las EROs. Estos sistemas pueden ser de origen endógeno, entre los que destacan antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la peroxiredoxinas, y los antioxidantes no enzimáticos como la coenzima Q10, la melatonina, la albúmina, la bilirrubina y el ácido úrico. Además, disponemos de antioxidantes exógenos que pueden ser obtenidos a través de los alimentos, o en forma de suplementos nutricionales. En este grupo

destacan los carotenoides, los flavonoides, los compuestos fenólicos, los compuestos organosulfurados, y las vitaminas C y E. Estos compuestos antioxidantes presentan diferentes mecanismos de acción, como la activación de enzimas antioxidantes, la quelación de metales, el bloqueo de la peroxidación lipídica o la eliminación de los radicales superóxido (Carocho & Ferreira, 2013).

Cuando se produce un exceso de moléculas oxidantes que no pueden ser neutralizadas por la defensa antioxidante, se origina un desbalance que recibe el nombre de estrés oxidativo y que se asocia con la aparición y desarrollo de diferentes procesos patológicos como: ECV, enfermedades respiratorias e inflamatorias, trastornos neurológicos, cáncer, etc. La etiopatogénesis de la HTA se ha vinculado también estrechamente con el estrés oxidativo. La producción excesiva y acumulación de EROs ocasiona interacciones con las estructuras celulares, como la modificación de las bases de los ácidos nucleicos produciendo mutagénesis y carcinogénesis. También alteran las estructuras proteicas mediante su inactivación y desnaturalización, y actúan sobre los lípidos provocando peroxidación lipídica, que tiene como efecto alteraciones en la integridad y funcionalidad de las membranas de los sistemas biológicos (Huang & Li, 2020). La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que provoca la formación de compuestos reactivos como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (HNE), que forman uniones cruzadas con las proteínas dando lugar a productos avanzados de lipoxidación (Ayala et al., 2014). Estos compuestos desencadenan una reacción en cascada que promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento asociados con la progresión de diferentes condiciones patológicas entre las que se encuentra la HTA (Perrone et al., 2020). De igual forma, las EROs producen la degradación de óxido nítrico, producido por las células endoteliales y cuya función principal es la regulación del tono vascular, siendo así el principal factor de relajación derivado del endotelio (EDRF, por sus siglas en inglés: *Endothelium-derived relaxing factor*) y uno de los mecanismos que también están implicados en el desarrollo de HTA (Tejero et al., 2019). El anión superóxido reacciona con el óxido nítrico dando lugar a peroxinitrito, una especie reactiva de nitrógeno con un alto poder oxidante, lo que supone una reducción en la biodisponibilidad de este agente vasodilatador (Cyr et al., 2020). Otro de los mecanismos involucrados en el control de la presión arterial es el sistema renina angiotensina aldosterona, cuyo agente efector, la angiotensina II, es producida por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Este péptido vasoconstrictor que desencadena la activación del sistema NAPH oxidasa, está

involucrado en la producción de EROs y, en última instancia, regula a la baja los niveles de óxido nítrico (Ding et al., 2020). De hecho, se ha observado que, en condiciones patológicas como es el caso de las ECV o la diabetes, en las que existe una desregulación del equilibrio redox, producido entre otros factores por unos niveles elevados de angiotensina II, se ha identificado una disfunción endotelial asociada en parte a una reducción en la biodisponibilidad del óxido nítrico (Li et al., 2016; Adams et al., 2021). De manera similar, se ha descrito una alteración de la homeostasis de óxido nítrico junto a un incremento de los niveles de angiotensina II y EROs en diferentes modelos experimentales de HTA (Carlström, 2021).

### **1.2.2. Tratamiento de la hipertensión arterial**

El principal objetivo del tratamiento de la HTA consiste en la reducción de la presión arterial hasta los valores de normalidad establecidos para cada paciente. Por ello, es especialmente importante conocer los factores causales de la HTA para poder así establecer un abordaje terapéutico efectivo. De acuerdo a las Guías de 2020 de la Sociedad Internacional de Hipertensión (ISH, por sus siglas en inglés: *International Society of Hypertension*) sobre el manejo de la HTA, la modificación del estilo de vida debe constituir la primera línea terapéutica en el abordaje de esta condición. Entre los factores modificables relacionados con el estilo de vida, encontramos el patrón dietético, el ejercicio y la actividad física, el descanso y el manejo del estrés, entre otros (Unger et al., 2020).

En relación al factor dietético existe un consenso generalizado entre las principales autoridades sanitarias como la ESC/ESH y la Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología (ACC/AHA, por sus siglas en inglés: “*American College of Cardiology/American Heart Association*”), que recomiendan un patrón dietético basado en la ingesta de vegetales, frutas, legumbres, frutos secos, cereales integrales y pescado, acompañado de un consumo reducido de carne roja y carne procesada, cereales refinados y bebidas azucaradas (Arnett et al., 2019). También se promueve la sustitución del consumo de grasas saturadas por monoinsaturadas y poliinsaturadas, así como una ingesta adecuada de sodio y colesterol dietético (Tabla 2).

**Tabla 2:** Recomendaciones dietéticas para pacientes con HTA (ESC & ESH, 2019)

Recomendación	Clase de evidencia	Nivel de evidencia
<b>Restringir la ingesta de sal a &lt; 5 g/día</b>	I	A
<b>Aumentar consumo de verduras, frutas frescas, frutos secos y ácidos grasos insaturados</b>	I	A
<b>Se aconseja reducir el consumo de carne roja y de lácteos grasos</b>	I	A
<b>Evitar los estados de ebriedad</b>	III	C
<b>Restringir el consumo de alcohol a:</b> En varones menos 14 unidades/semana* En mujeres menos de 8 unidades/semana*	I	A

\*1 unidad alcohol = 125 ml de vino o 250 ml de cerveza. La recomendaciones se realizan según la clase de evidencia: clase I (evidencia fuerte de beneficio), clase IIa (evidencia moderada de beneficio), clase IIb (evidencia débil de beneficio) y clase III (evidencia fuerte riesgo); y acorde al nivel de evidencia: nivel A (datos procedentes de meta-análisis y ensayos controlados aleatorizados de alta calidad), nivel B (datos procedentes de un único ensayo controlado aleatorizado o de grandes estudios no aleatorizados) y nivel C (consenso de opinión de expertos, pequeños estudios y/o estudios retrospectivos).

Estas recomendaciones dietéticas se encuentran incluidas en la dieta DASH, una estrategia desarrollada en los años 90 por el Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés: *National Institute of Health*) para el manejo de la HTA (Appel et al., 1997). En concreto, este planteamiento dietético se caracteriza por el consumo de frutas, vegetales, cereales integrales, frutos, legumbres y lácteos desnatados, junto a una restricción en la ingesta de carne roja y procesada, bebidas azucaradas y sodio (Ibsen et al., 2022). En un meta-análisis en el que se evaluó el potencial antihipertensivo de esta estrategia dietética se constató cómo este patrón dietético fue capaz de producir una reducción de 3,2 mm Hg en la PAS y de 2,5 mm Hg en la PAD. Este efecto antihipertensivo fue independiente del estadio inicial de HTA, y fue superior en individuos con obesidad y menores de 50 años (Filippou et al., 2020). Aunque en menor grado que la dieta DASH, otros enfoques nutricionales también pueden ser de interés por su potencial antihipertensivo como es el caso de la dieta mediterránea. Esta estrategia dietética ha demostrado una reducción en la PAS y en la PAD de 1,4 y 0,7 mm Hg, respectivamente (Nissensohn et al., 2016). En el momento actual, el creciente interés de la población por llevar a cabo una alimentación basada en

plantas, no solo desde el punto de vista saludable sino también desde un punto de vista medioambiental, ha permitido evaluar la utilidad terapéutica de este tipo de dietas sobre los diferentes factores de riesgo cardiovascular. En este sentido, en un estudio realizado en individuos hipertensos que siguieron una dieta basada en plantas durante 4 semanas, se evidenció una reducción de la presión arterial, tanto de la PAS y PAD, de 16,6 y 9,1 mm Hg, respectivamente. Dicha disminución fue acompañada además de una reducción del 33% en el uso de medicamentos prescritos para la HTA (Najjar et al., 2018).

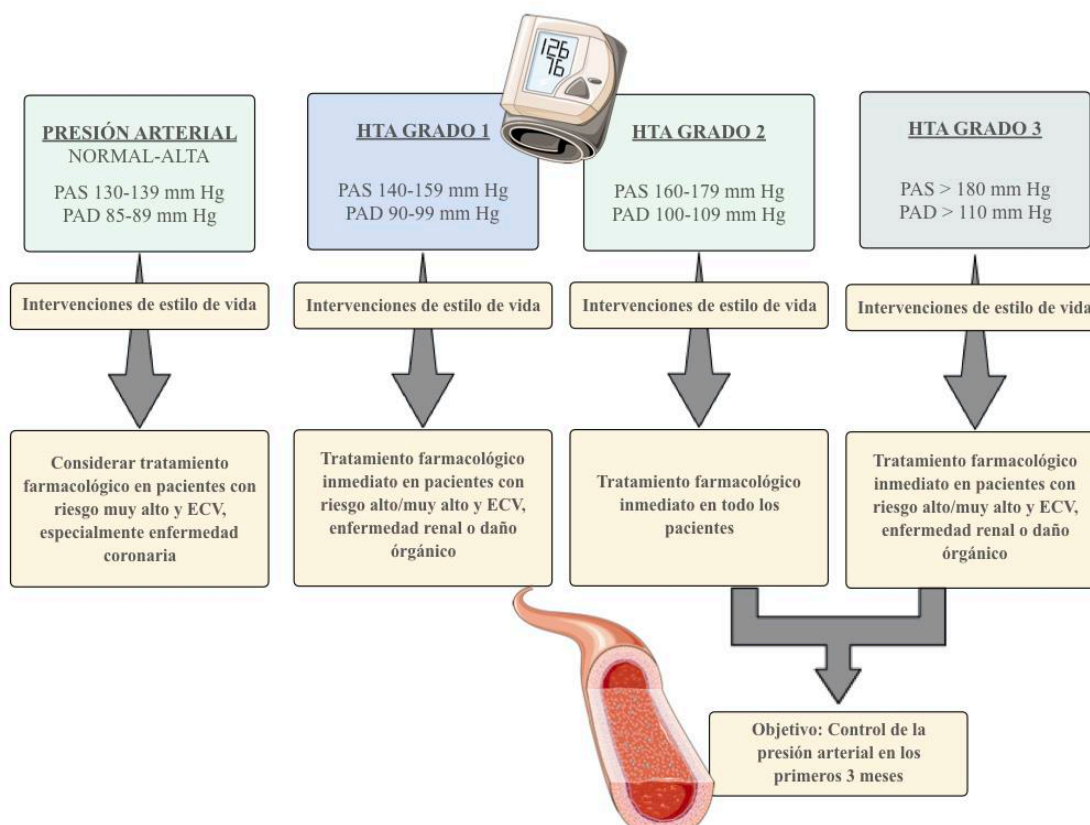
Como ya se ha mencionado, la obesidad también se considera un factor de riesgo cardiovascular, y los efectos beneficiosos observados sobre la presión arterial han sido vinculados también en parte con una reducción del peso corporal asociado a estas intervenciones del estilo de vida. De hecho, la HTA y la obesidad son condiciones que se encuentran interconectadas a través de múltiples mecanismos fisiopatológicos. En sujetos con obesidad, la prevalencia de HTA es del 60-77%, comparado con el 34% de prevalencia de HTA en individuos con normopeso o peso corporal adecuado (Fantin et al., 2019). Un meta-análisis realizado por la organización Cochrane concluyó que una reducción del peso corporal equivalente a 4 kg se asocia con una reducción de 4,5 y 3,2 mm Hg en la PAS y la PAD, respectivamente (Semlitsch et al., 2016).

Otro de los pilares básicos del estilo de vida determinantes en la mejora de la salud cardiovascular lo constituye la práctica de ejercicio físico. De acuerdo a los resultados de diferentes estudios, la práctica regular de ejercicio aeróbico es capaz de inducir una reducción en la PAS de 5 mm Hg y en la PAD de entre 3 a 5 mm Hg (Alpsoy, 2020; Saco-Ledo et al., 2020). Además, la combinación de ejercicio físico aeróbico y de fuerza ha demostrado tener un efecto superior al observado en cada una de las intervenciones por separado (Sousa et al., 2013). Este efecto antihipertensivo del ejercicio físico es de especial relevancia si tenemos en consideración que por cada 10 mm Hg que disminuye la PAS se logra una reducción del 27% y del 28% en el riesgo de enfermedades cerebrovasculares e insuficiencia cardíaca, respectivamente (Ettehad et al., 2016).

Se sabe, además, que la combinación de diferentes factores de estilo de vida puede ocasionar un efecto sinérgico en la reducción de la presión arterial. En un estudio controlado aleatorizado se evaluó el efecto de una dieta DASH combinada con 15-20 minutos de actividad física diaria en sujetos con diabetes y HTA no controlada. Transcurridas 4 semanas

desde la intervención se observó una reducción en la PAS y en la PAD de 17,6 y 3,9 mm Hg, respectivamente (Paula et al., 2015).

Sin embargo, cuando las modificaciones del estilo de vida establecidas son insuficientes para reducir la presión arterial hasta el rango adecuado a cada paciente, el tratamiento farmacológico adquiere especial relevancia terapéutica. Es importante tener en cuenta que las guías para el diagnóstico y manejo del Instituto Nacional para la Calidad de la Sanidad y de la Asistencia (NICE, por sus siglas en inglés: *National Institute for Health and Care Excellence*) han dictaminado que no existen beneficios clínicos significativos que justifiquen el tratamiento farmacológico en personas con una PAS inferior a 140 mm Hg (National Guideline Centre, 2019). En los casos necesarios podría considerarse el tratamiento farmacológico de forma individualizada ante la existencia previa de ECV en el paciente, especialmente de enfermedad coronaria. Asimismo, en el caso de niveles de PAS comprendidos entre 140-159 mm Hg y niveles de PAD de entre 90-99 mm Hg, se valora el tratamiento farmacológico en pacientes con ECV, enfermedad renal o daño orgánico. En situaciones en las que se superan estos niveles de presión arterial el inicio del tratamiento farmacológico es inmediato. De acuerdo a la ESC/ESH, cuando existe tratamiento farmacológico, la reducción de la presión arterial en la mayoría de pacientes debería establecerse en valores inferiores a 140/90 mm Hg de PAS y PAD, respectivamente (ESC & ESH, 2019). En la Figura 1 se muestra el algoritmo de intervención que se utiliza para el tratamiento de la HTA.



**Figura 1:** Algoritmo de intervención para el tratamiento de pacientes con HTA (ESC & ESH, 2019). HTA: Hipertensión; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólicas; ECV: Enfermedad cardiovascular.

Las intervenciones farmacológicas utilizadas en la actualidad para el tratamiento de la HTA incluyen fármacos clásicos, como son los diuréticos y los betabloqueantes, y fármacos más recientes como los antagonistas de los canales de calcio, los compuestos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARAI) (ESC & ESH, 2019). El uso específico de esta clase de fármacos procede de la eficacia constatada para reducir la presión arterial, las complicaciones cardiovasculares asociadas y la morbi-mortalidad. De igual forma, existen contraindicaciones relativas y absolutas para cada uno de los fármacos antihipertensivos, por ello el tratamiento idóneo debe considerarse individualmente para cada paciente (Ojha et al., 2021). Sin embargo, aunque la detección, control y tratamiento de la HTA puede resultar sencillo, la realidad es que, al menos en España, solo entre un 5% y un 10% de los pacientes hipertensos recibe un tratamiento adecuado (Wolf-Maier et al., 2004). Una de las grandes limitaciones del tratamiento antihipertensivo es la adherencia al mismo, lo que impacta de



forma negativa en la progresión de la enfermedad. Se ha estimado que hasta un 45% de los pacientes no se adhieren satisfactoriamente a las pautas farmacológicas prescritas (Abegaz et al., 2017). De hecho, la baja adherencia al tratamiento antihipertensivo se asocia con un aumento de la presión arterial y un peor pronóstico del paciente (Unger et al., 2020), y se ha descrito que aquellos sujetos con peor adherencia al tratamiento presentan un incremento del 27% del riesgo de sufrir ECV (Xu et al., 2017).

Es importante también destacar el uso de las terapias antioxidantes en el tratamiento de la HTA, ya que como se ha comentado con anterioridad, el estrés oxidativo desempeña un papel determinante en el origen y desarrollo de la fisiopatogénesis de la HTA, así como en la disfunción arterial asociada a esta enfermedad. Se sabe, además, que algunos de los agentes antihipertensivos como los IECAs, los ARAII, los  $\beta$ -bloqueantes y los bloqueantes de canales de  $\text{Ca}^+$ , ejercen también sus efectos beneficiosos a través de mecanismos de disminución del estrés oxidativo (García-Sánchez et al., 2020).

### **1.2.3. Hipertensión arterial y terapia antioxidante**

Recientemente, se ha evidenciado que el consumo de alimentos vegetales con un elevado aporte en compuestos antioxidantes provoca un aumento de los sistemas de defensa antioxidante del organismo y del estatus antioxidante plasmático, lo que supone una protección frente a diferentes factores de riesgo cardiovascular (Pavadhgul et al., 2019; Garcia & Blesso, 2021;). Del mismo modo, estrategias dietéticas orientadas a la reducción de la presión arterial como la dieta DASH, que incluye también un alto contenido de alimentos de origen vegetal, ha demostrado inducir un aumento de la capacidad antioxidante del plasma (Azadi-Yazdi et al., 2017). También se ha descrito que las terapias con diferentes antioxidantes administrados de forma aislada, son capaces de atenuar el estrés oxidativo y mejorar la funcionalidad renal y el remodelado cardiovascular, dando como resultado un descenso de la presión arterial en modelos animales de HTA (Luo et al., 2020; Zuo & Jiang, 2020). Sin embargo, en humanos todavía existe bastante controversia acerca de la utilidad de los suplementos dietéticos antioxidantes para el tratamiento de la HTA. Se han llevado a cabo diferentes meta-análisis para dilucidar el efecto de las vitaminas antioxidantes en la prevención y/o el tratamiento de las ECV. Sin embargo, en estos estudios no se han observado efectos beneficiosos clínicamente significativos de los suplementos con vitaminas antioxidantes sobre la presión arterial, y tampoco sobre el riesgo de sufrir eventos

cardiovasculares (Ye et al., 2013; Jenkins et al., 2018; Li et al., 2018). Incluso en una revisión realizada por la organización Cochrane se observó un aumento de la mortalidad asociada a la ingesta de suplementos antioxidantes como beta-carotenos y vitamina E, desaconsejando así el uso de estos suplementos en la población general como medida preventiva de las ECV (Bjelakovic G & Gluud, 2012). De hecho, el consumo excesivo de suplementos de carotenoides o tocoferoles se ha relacionado con la formación de radicales lipídicos, propagando así reacciones de peroxidación lipídica (Pisoschi et al., 2021). Todo ello ha ocasionado que la ingesta excesiva de suplementos dietéticos antioxidantes se haya relacionado con un efecto prooxidante denominado estrés antioxidante (Poljsak & Milisav, 2012). Esta situación se produce cuando un antioxidante capta un radical libre y no se recupera, por lo que, en el siguiente paso de la cadena metabólica, se convierte en un compuesto prooxidante. Por ello, una dieta saludable que incluya suficientes alimentos de origen vegetal proporciona generalmente una adecuada cantidad de compuestos antioxidantes, y la ingesta adicional de suplementos dietéticos antioxidantes puede ocasionar un desequilibrio entre la generación y eliminación de EROs. Esto sugiere que, en personas con un patrón dietético saludable y un adecuado estatus antioxidante, el abuso de suplementos antioxidantes no es recomendable porque podrían provocar efectos contrarios a los esperados y desencadenar una reacción prooxidante (Lee et al., 2005; Ceriello, 2008; Engwa et al., 2020;).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que cuando se han evaluado específicamente los beneficios a nivel cardiovascular que proporciona el consumo de alimentos de origen vegetal (generalmente ricos en compuestos antioxidantes), se ha observado que aportan efectos beneficiosos superiores sobre diferentes factores de riesgo cardiovascular, en comparación con aquellas intervenciones basadas en la administración de suplementos dietéticos antioxidantes (Ceriello, 2008; Alissa & Ferns, 2017). Una posible explicación a este hecho es que un alimento es una matriz conformada por un conjunto de compuestos que interactúan entre sí, lo que, en última instancia, determina su potencial impacto sobre la salud. Este efecto se conoce como sinergia alimentaria y explica en parte porque no podemos inferir una misma propiedad funcional a un compuesto aislado respecto al mismo presente en una matriz compleja como es un alimento (Jacobs & Tapsell, 2013). Por todo ello, estas singularidades que ofrecen los compuestos bioactivos presentes en los alimentos y que pueden ser potencialmente beneficiosas para la salud, deben considerarse en el diseño y obtención de un alimento funcional.

### **1.3. Modelos experimentales para el estudio del estrés oxidativo y de la hipertensión arterial**

#### **1.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 como organismo modelo para evaluar la actividad antioxidante *in vivo***

La legislación vigente relativa al uso de animales de experimentación establece una serie de condiciones que dificultan muchos de los ensayos *in vivo* a nivel legal, ético y social. Es por ello que, siguiendo la regla de las tres erres (reemplazar, reducir y refinar), se están buscando modelos de investigación alternativos a los animales de experimentación (especialmente para roedores y otros mamíferos) (Sneddon et al., 2017). Entre las alternativas analizadas, las levaduras y, en concreto, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), se ha postulado como uno de los organismos modelo más relevante para la investigación de procesos relacionados con la fisiología humana como el envejecimiento, la restricción calórica o la respuesta a agentes antineoplásicos (Matuo et al., 2012; Kapahi et al., 2017; Zimmermann et al., 2018). El uso de *S. cerevisiae* supone una serie de ventajas: es un organismo de fácil manejo y manipulación genética; presenta un corto ciclo de vida que facilita el estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de envejecimiento; posibilita investigar con millones de células en cultivos de poco volumen; contiene un alto grado de conservación de muchos de los procesos celulares comunes entre levaduras y células humanas (Nielsen, 2019; Yalcin & Lee, 2019; Pérez de Vega et al., 2020). Es por ello que muchos de los grandes avances realizados en los últimos años en biomedicina han sido llevados a cabo en este modelo experimental. De hecho, en 2001, Leland Hartwell, Paul Nurse y Tim Hunt fueron galardonados con el premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus avances en la comprensión de los mecanismos de control del ciclo celular. En concreto, Hartwell identificó varios de los genes esenciales para el desarrollo celular a raíz de las investigaciones realizadas en *S. cerevisiae* (Hohmann, 2016). Posteriormente Yoshinori Ohsumi recibió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2016 por sus investigaciones también realizadas en *S. cerevisiae* acerca del proceso de autofagia (mecanismo natural de renovación celular en el que las células de nuestro organismo se deshacen de componentes y estructuras dañadas a través de los lisosomas), y que supusieron un gran progreso en el conocimiento de este proceso de homeostasis celular (Ohsumi, 2014). Estos son algunos de los casos que ponen de manifiesto la relevancia e interés de este modelo experimental como una alternativa viable a la experimentación animal.

Tradicionalmente la actividad antioxidante de los diferentes compuestos bioactivos ha sido atribuida a la capacidad de neutralizar las EROs. Sin embargo, también pueden actuar regulando los procesos de señalización celular involucrados en los mecanismos de defensa celular. Este fenómeno se conoce como xenohormesis. En este contexto, se ha descrito cómo el flavonoide quercetina es capaz de incrementar la resistencia al estrés oxidativo en levaduras (Howitz & Sinclair, 2008). En concreto, la quercetina reguló la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis, la glucogenolisis y la biosíntesis de trehalosa, un disacárido de glucosa con propiedades antioxidantes (Vilaça et al., 2012). De forma similar, un extracto de cacao enriquecido en flavonoides mostró un efecto protector frente al estrés oxidativo en *S. cerevisiae*, debido en parte a la regulación de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos como *llv1*, *Pro2*, *Hom6* y *Yhb1*, involucrados en las vías de señalización de enzimas antioxidantes tales como la glutatión reductasa, la glutatión transferasa o la catalasa (Peláez-Soto et al., 2020). Un reciente estudio comprobó como algunas de las fracciones peptídicas obtenidas de hidrolizados de proteínas de chíá incrementaron la tasa de supervivencia de la levadura en condiciones de estrés oxidativo (Silveira Coelho et al., 2019). Estos trabajos demuestran que, aunque las investigaciones usando *S. cerevisiae* como modelo *in vivo* para dilucidar el potencial antioxidante de ingredientes o alimentos funcionales son muy limitadas, los resultados obtenidos, sin embargo, son prometedores.

Estos modelos se consideran, por lo tanto, una primera aproximación *in vivo* para evaluar los mecanismos moleculares de actuación de un determinado compuesto, reduciendo así la experimentación en modelos animales superiores. Sin embargo, todavía existen investigaciones que requieren del uso de modelos murinos como es el caso del estudio de la HTA.

### **1.3.2. Modelos murinos para el estudio de la HTA**

Para poder identificar y estudiar los factores involucrados en la etiología de una enfermedad, habitualmente se recurre a modelos animales con unas características fisiológicas similares a las de pacientes con la patología de interés. Estos estudios en modelos animales permiten reconocer los factores de riesgo, mecanismos específicos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, así como posibles vías terapéuticas frente a la prevención, aparición y desarrollo de la condición patológica. Los modelos animales utilizados deben presentar una serie de características: modelos de fácil desarrollo, relativamente económicos,

animales de pequeño tamaño, manejables y adecuados que permitan identificar las propiedades terapéuticas de los agentes antihipertensivos de estudio (Lerman et al., 2019).

En la investigación de las ECV, y concretamente para el estudio de la HTA, la utilización de modelos murinos está ampliamente extendida, ya que permiten llevar a cabo procedimientos experimentales que en humanos no serían factibles. Entre los modelos experimentales más utilizados destaca el uso de ratas, ya que poseen un tamaño adecuado lo que facilita su manejo, así como un coste económico relativamente bajo. Es por ello que se han desarrollado diferentes modelos de rata para el estudio de la HTA y, entre ellos, los modelos de origen genético son los más utilizados.

Uno de los modelos experimentales de origen genético más utilizado para el estudio de la HTA es la rata espontáneamente hipertensa (SHR, por sus siglas en inglés: *Spontaneously Hypertensive Rat*). La HTA en este modelo experimental tiene un carácter genético y su desarrollo es similar al descrito en la especie humana. El modelo experimental de rata SHR fue el resultado de cruces consanguíneos como intento para conseguir ratas hipertensas. Okamoto y Aoki en 1963, realizaron cruces entre un macho de la cepa Wistar (WKY, por sus siglas en inglés: *Wistar Kyoto*) que desarrolló HTA espontánea y una hembra con una presión arterial elevada. Tras el posterior apareamiento entre los descendientes con PAS superior a 150 mm Hg se obtuvo la nueva cepa de ratas SHR, a partir de la sexta generación endogámica (Lerman et al., 2019). Las ratas WKY se utilizan dentro de un diseño experimental con ratas SHR como control normotenso. Teniendo en consideración el origen del modelo experimental de HTA en ratas SHR, algunos autores han sugerido a las ratas WKY como modelo experimental de ratas pre-hipertensas. La esperanza media de vida la rata SHR es de 18 meses, en condiciones normales de cuidado y mantenimiento, a diferencia de las ratas WKY que viven alrededor de unos 24 meses (Okamoto & Aoki, 1963; Doggrell & Brown, 1998).

En las ratas SHR la presión arterial comienza a incrementarse sustancialmente a las 6-7 semanas de vida, alcanzando unos niveles estables de HTA a las 17-19 semanas. La desregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la disfunción renal y el estrés oxidativo son algunos de los mecanismos involucrados en el desarrollo de HTA en este modelo animal (Reckelhoff et al., 2018). De igual forma, en ratas SHR se ha constatado un incremento sustancial de la resistencia periférica total, lo que ocasiona un aumento significativo del gasto cardíaco hasta el establecimiento de la condición de HTA (Doggrell

& Brown, 1998). Esta puede agravarse debido a diferentes factores de riesgo como una dieta alta en sodio, el estrés y condicionantes ambientales (Varagic et al., 2010; Wsol et al., 2019). Sin embargo, existen diferencias entre la HTA humana y la HTA de las ratas SHR. A nivel farmacológico, las ratas SHR no manifiestan una respuesta específica derivada del uso de diuréticos, mientras que en humanos se observa una reducción sustancial de la presión arterial tras la administración de este fármaco. De igual modo, la alteración de la funcionalidad tiroidea es generalizada en las ratas SHR, sin embargo, en pacientes con HTA no ocurre en todos los casos. Otra importante diferencia sucede en relación al desarrollo de arterioesclerosis, situación frecuente entre los sujetos con HTA, no así en el caso de ratas SHR (Okamoto & Aoki, 1963; Trippodo & Frohlich, 1981). Asimismo, en humanos la HTA suele concurrir con un exceso de peso corporal (Mendoza et al., 2020), mientras que las ratas SHR tienen un peso corporal inferior que sus controles normotensos (Füredi et al., 2016)

#### **1.4. Alimentos e ingredientes funcionales**

El término "alimento funcional" tiene su origen hace más de 30 años en Japón, país pionero en cuanto al desarrollo y uso de este nuevo concepto de alimentos y donde se comercializan como "Alimentos para uso específico de la salud" (FOSHU, por sus siglas en inglés: *Food for Specified Health Uses*). Unos años más tarde esta tendencia llegó a Europa, donde la Comisión Europea constituyó en 1995 una comisión para elaborar un documento de consenso y establecer las bases científicas sobre los Alimentos Funcionales. Este proyecto se denominó FUFUSE (de sus siglas en inglés: *Functional Food Science in Europe*) y fue coordinado por el *International Life Sciences Institute* (ILSI). El documento resultante de esta acción conocido como "Conceptos científicos sobre los alimentos funcionales en Europa" estableció la bases y criterios para el futuro desarrollo científico de estos alimentos (Olagnero et al., 2007). De esta acción concertada se obtuvo la primera definición con carácter general de alimento funcional en Europa:

*"Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo humano de modo que mejora el estado de salud y reduce el riesgo de contraer enfermedad".*

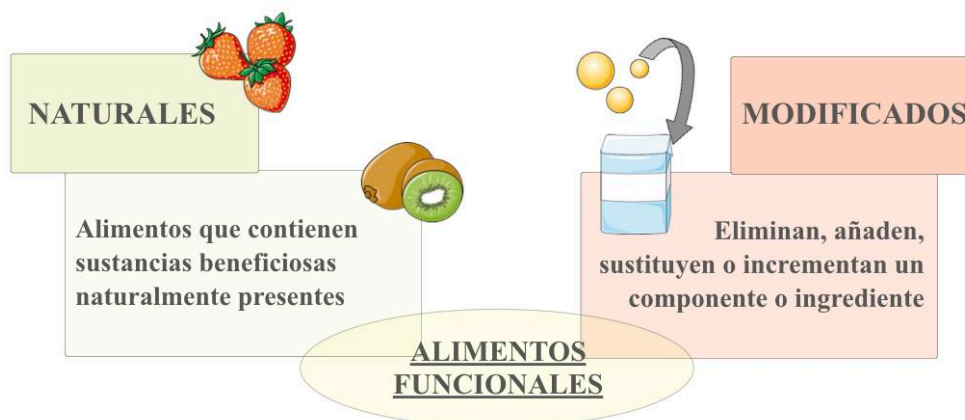
En el momento actual, existe una amplia variedad de alimentos funcionales en el mercado que manifiestan su carácter funcional al ejercer determinados efectos beneficiosos para la salud más allá de sus propiedades nutricionales. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés: *European Food Safety Authority*) es la encargada de regular a nivel europeo las alegaciones de salud alimentaria, mediante las pautas establecidas por el Reglamento (CE) nº1924/2006, del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos. Este reglamento supuso un punto de inflexión, ya que estableció el primer marco regulatorio para armonizar y coordinar las declaraciones nutricionales y de salud. En dicho reglamento se constituyeron las condiciones para el uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables presentes en el etiquetado de cualquier alimento que desee realizar una alegación de salud (Aggett et al., 2005). A continuación, se detallan las condiciones que indica el Reglamento:

- a) El alimento o el ingrediente sobre el cuál se desea efectuar la alegación de salud debe estar adecuadamente caracterizado.
- b) El efecto nutricional o fisiológico a alegar debe poseer suficiente respaldo científico, mediante la realización de estudios de intervención diseñados correctamente y en un grupo representativo de la población general a la que vaya destinado el ingrediente o alimento en cuestión.
- c) La relación entre el consumo del alimento o ingrediente alimentario y su efecto fisiológico en el organismo debe haber sido evidenciado en estudios experimentales.
- d) Deben identificarse el mecanismo de acción mediante el cual el alimento o el ingrediente en estudio realiza su actividad fisiológica.

Una definición más reciente incluye los aspectos anteriormente mencionados, y define los alimentos funcionales como aquellos que incluyen componentes que, consumidos como parte de una dieta normal, poseen actividad biológica y proporcionan efectos beneficios para la salud del consumidor y/o son capaces de reducir el riesgo de sufrir ciertas enfermedades (Granato et al., 2020)

Los alimentos funcionales se pueden clasificar de acuerdo a su origen, dependiendo de si los componentes bioactivos están presentes de forma intrínseca en el propio alimento

(naturales) como por ejemplo el omega-3 presente en el pescado azul, el sulforafano en el brócoli y el licopeno en el tomate, o si se obtienen modificando los componentes del mismo a través de diferentes procedimientos tecnológicos (modificados) como por ejemplo la leche enriquecida en fibra, margarina enriquecida con fitoesteroles y los huevos ricos en omega-3 (Figura 2) (Beltrán de Heredia, 2016). De acuerdo al marco legislativo vigente relativo al Reglamento (CE) n°1924/2006, en el etiquetado de estos alimentos debe indicarse la importancia de una dieta variada y equilibrada, la cantidad requerida para obtener el efecto declarado y, en su caso, una advertencia dirigida a las personas que deban evitar su consumo, así como la cantidad a partir de la cuál puede existir un riesgo para salud.



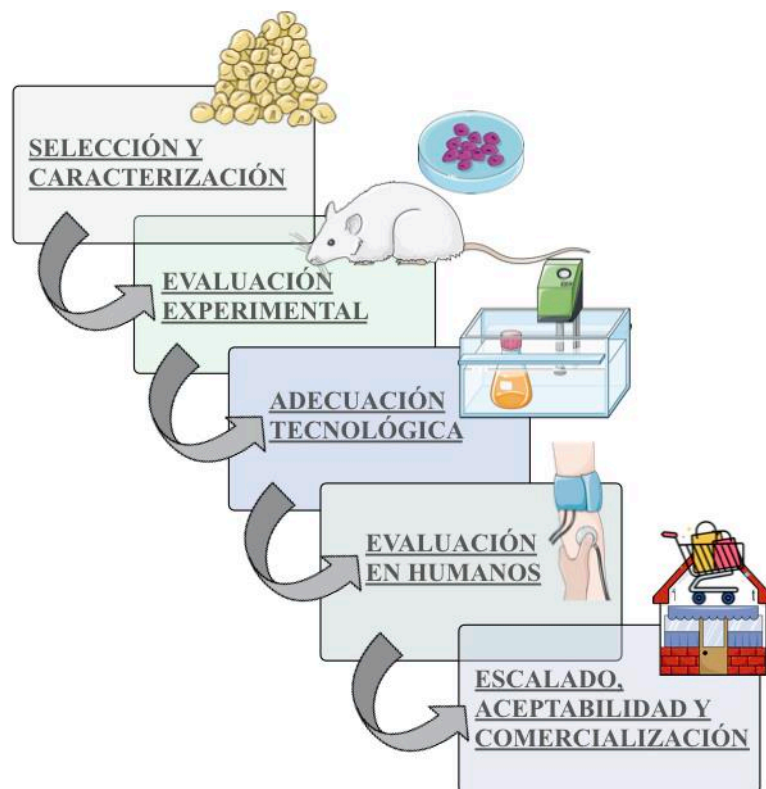
**Figura 2.** Clasificación de los alimentos funcionales en relación al Reglamento (CE) n°1924/2006.

En base a esta reglamentación sobre las propiedades beneficiosas de un alimento más allá de su efecto nutritivo, podemos distinguir dos tipos de declaraciones: nutricionales y de propiedades saludables. Las declaraciones nutricionales hacen referencia a cualquier alegación que afirme, sugiera o dé a entender que un determinado alimento por su contenido energético, presencia o ausencia de nutrientes posee propiedades nutricionales beneficiosas. En cambio, las declaraciones de propiedades saludables se refieren a aquellas alusiones que vinculen un determinado alimento o uno de sus nutrientes o componentes con la salud (Reglamento (CE) n°1924/2006).

Teniendo en cuenta toda esta información relativa a los alimentos funcionales, para su desarrollo, se deben cumplir una serie de etapas necesarias antes de llegar a su comercialización. En primer lugar, se requiere la selección y caracterización *in vitro* del compuesto o ingrediente bioactivo, para posteriormente confirmar su actividad biológica *in*



*vivo* mediante la utilización de un modelo experimental que permita mimetizar la condición fisiopatológica de interés. En este sentido, los modelos experimentales en animales permiten dilucidar los mecanismos de acción a través de los cuáles dicho compuesto bioactivo puede ejercer su actividad biológica en el organismo, a nivel celular y molecular, utilizando para ello diferentes técnicas específicas como la expresión génica y la expresión de proteínas (Mine et al., 2009). De igual modo, también es necesario evaluar las posibles interacciones del ingrediente o compuesto bioactivo con otros compuestos de la matriz alimentaria, así como su concentración en el nuevo alimento, los procesos culinarios de preparación y su forma habitual de consumo. Esta fase se conoce como adecuación tecnológica y es determinante para asegurar el éxito en las etapas posteriores del desarrollo de un alimento funcional (Medina et al., 2010; Roberfroid et al., 2010). Tras la obtención de resultados favorables en estas etapas previas, será necesario llevar a cabo ensayos clínicos en humanos que permitan evaluar la efectividad e inocuidad del alimento funcional en desarrollo. Del mismo modo, los estudios de intervención en humanos permitirán establecer la dosis óptima del alimento funcional, así como el potencial consumo de riesgo en la población general y en determinados colectivos (Vettorazzi et al., 2020). Por último, y una vez superada con éxito esta fase, el alimento o ingrediente funcional debe demostrar su viabilidad en el escalado industrial así como su aceptación por el consumidor antes de proceder a su comercialización. En la figura 3 se describen las distintas etapas necesarias para el desarrollo de un ingrediente o alimento funcional.



**Figura 3.** Fases del desarrollo y elaboración de un alimento funcional.

En la actualidad, hay desarrollados una gran variedad de ingredientes bioactivos que pueden ser incluidos dentro de alimentos funcionales. En la tabla 3 se muestran aquellos componentes bioactivos cuya actividad biológica ha sido ampliamente evidenciada, lo que ha permitido en algunos casos el desarrollo de productos funcionales con un gran éxito comercial. Es importante señalar en este punto que el éxito o el fracaso de un nuevo alimento o bebida en el mercado está influenciado en gran medida de las reacciones totalmente subjetivas del consumidor. El éxito de un nuevo producto va a depender principalmente de su calidad sensorial, utilizando la aceptabilidad y preferencia como indicadores del consumo de alimentos (MacFie et al., 2007). Determinantes como la aceptabilidad, preferencia e intención de compra son la base del éxito de un producto en el mercado (Lee & O'Mahony, 2005). Por lo tanto, a la hora del diseño de un nuevo alimento o ingrediente va a ser fundamental no sólo el valor biológico y nutricional sino también las propiedades sensoriales del mismo (aspecto, color, textura, aroma y sabor) (Villegas et al., 2010; Spence, 2015).

**Tabla 3.** Componentes bioactivos y actividad biológica demostrada.

COMPONENTE BIOACTIVO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
<b>ÁCIDOS GRASOS</b> Ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido linoleico conjugado (CLA).	Anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiano, cardioprotector, hipocolesterolemia, neuroprotector (Vázquez et al., 2019; Mazzocchi et al., 2021)
<b>POLISACÁRIDOS</b> Quitina, fucoidanos, laminaranos.	Anticancerígena, antimicrobiana, antitrombótica, antiviral, inmunomoduladora (Hayes & Tiwari, 2015; Hentati et al., 2020)
<b>FITOQUÍMICOS</b> Alcaloides, betalainas, compuestos sulfurados, fitoesteros, terpenos, polifenoles	Antihipertensiva, antidiabético, antiinflamatoria, antioxidante, cardioprotector, neuroprotector hipocolesterolemia (Cámara et al., 2021)
<b>PROBIÓTICOS</b> <i>Bifidobacterium, Lactobacillus, Saccharomyces</i>	Anticancerígena, antihipertensiva, detoxificadora, inmunestimuladora, supresora de la hipersensibilidad, reductora de infecciones gastrointestinales y urogenitales, inmunomoduladora (Chugh & Kamal-Eldin, 2020; Sharifi-Rad et al., 2020)
<b>FIBRAS CON EFECTO PREBIÓTICO</b> Fructooligosacáridos (FOS), galactanos, galactósidos, inulina.	Anticancerígena, anticolesterolemia, antidiabética, moduladora del tracto intestinal, reductora pH intestinal, inmunomoduladora (Ashwini et al., 2019; Cardoso et al., 2021)
<b>PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS</b>	Antioxidante, anticancerígena, anticoagulante, antihipertensiva, antiinflamatoria, antimicrobiana, hipocolesterolemia, inmunomoduladora, quelante (Xu et al., 2019; Jakubczyk et al., 2020;)
<b>VITAMINAS y MINERALES</b>	Anticancerígena, antioxidante, anticolesterolemia, antihipertensiva, antiinflamatoria, antiosteoporosis, antiviral (Dhalaria et al., 2020; Cámara et al., 2021)

Teniendo en cuenta que la HTA es un factor clave en el riesgo de sufrir ECV y sus complicaciones asociadas, se considera de vital importancia desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el abordaje de esta enfermedad de amplia prevalencia en la sociedad actual. Por ello, en los últimos años uno de los objetivos o líneas de investigación más destacadas en las Ciencias de la Alimentación ha sido la búsqueda de determinados compuestos de origen alimentario con actividad antioxidante que pudieran tener un potencial efecto antihipertensivo para utilizarlos como ingredientes en la obtención de alimentos funcionales útiles en la prevención y/o el tratamiento de la HTA y/o del estrés oxidativo asociado al desarrollo de esta patología.

### 1.4.1. Hidrolizados de proteínas alimentarias y péptidos bioactivos

De los diferentes componentes alimentarios, las proteínas constituyen una de las fuentes más relevantes para la obtención de alimentos funcionales. Las proteínas procedentes de la dieta son necesarias para mantener un óptimo balance entre la síntesis y degradación proteica, conocido como *turnover* proteico. Pero, además, el valor biológico es un concepto crucial para determinar la calidad de una determinada proteína. El valor biológico o la calidad de la proteína de un determinado alimento se obtiene en base a la proporción de aminoácidos esenciales que contiene. Los aminoácidos esenciales se definen como aquellos aminoácidos que el propio organismo no puede sintetizar por sí mismo y que deben ser incorporados a través de la dieta. De los 20 aminoácidos que forman las proteínas, 9 son los considerados como esenciales para el ser humano (lisina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, treonina, tripófano, valina e histidina). Sin embargo, esta forma de medir la calidad de las proteínas que solo considera la proporción de aminoácidos esenciales que contiene cada proteína, no tiene en cuenta otros factores relevantes como es la digestión de la proteína o su interacción con otros compuestos dietéticos antes de su absorción. Esta limitación ha sido solventada por métodos como la Puntuación de Aminoácidos Corregida por la Digestibilidad de las Proteínas (PDCAAS, por sus siglas en inglés: *Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score*) y el Índice de Aminoácidos Indispensables Digestibles (DIAAS, por sus siglas en inglés: *Digestible Indispensable Amino Acid Scores*) (Boye et al., 2012). El método PDCAAS está basado en el perfil de aminoácidos esenciales corregido por la digestibilidad fecal, mientras que el DIAAS fue desarrollado posteriormente y utiliza en este caso la digestibilidad ileal, ya que aporta resultados más precisos de la absorción real de los aminoácidos (Mathai et al., 2017).

Tradicionalmente el consumo de proteínas de origen animal ha sido incentivado por su mayor calidad, basada tanto en su aminograma como en su biodisponibilidad. Por ello, una gran mayoría de las investigaciones realizadas han sido enfocadas en las proteínas de origen animal (García et al., 2013). Sin embargo, en los últimos años, las proteínas de origen vegetal están adquiriendo gran interés para la obtención de compuestos con actividad biológica. La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*) se ha referido a las plantas como una fuente rica en proteínas de alta calidad, y destaca como ventajas su densidad nutricional, su menor impacto medioambiental y su ausencia de grasas saturadas y colesterol dietético (FAO &

WHO, 2019). En el informe de la comisión EAT-LANCET de 2019, se promueve aumentar el consumo de fuentes proteicas de origen vegetal como cambio hacia un patrón dietético más sostenible y saludable (Willett et al., 2019). Aunque tradicionalmente la calidad proteica atribuida a los alimentos de origen vegetal se ha considerado inferior a la de alimentos de origen animal, esta situación está cambiando cuando se observa desde una perspectiva global, y se considera un patrón de dieta constituido por distintas fuentes proteicas, el impacto sobre la salud y sobre el medioambiente. Este nuevo paradigma respecto a las recomendaciones proteicas es consecuencia de numerosas investigaciones que han mostrado cómo el potencial efecto beneficioso y nutritivo de la proteína dietética difiere considerablemente en función de la matriz alimentaria en la que se encuentra (Huang et al., 2020; Meng et al., 2021). Recientemente, el panel internacional de expertos en lípidos (ILEP, por sus siglas en inglés: *International Lipid Expert Panel*) recomendó una ingesta de proteína vegetal superior al 50% del consumo proteico diario como patrón dietético protector frente al riesgo de ECV (Zhubi-Bakija et al., 2021). Asimismo, en el estudio INTERMAP (de sus siglas en inglés: *The International Study of Macro- and Micro-Nutrients*) se observó que el consumo de proteína de origen vegetal, a diferencia de la de origen animal, estaba asociado con valores más bajos de presión arterial (Elliott et al., 2006).

Además de la calidad nutritiva, en los últimos años se ha descrito el potencial bioactivo de algunas de estas proteínas alimentarias a diferentes niveles. Dentro de las proteínas destacan, por sus múltiples propiedades funcionales y tecnológicas, los péptidos bioactivos, que se definen como secuencias de aminoácidos inactivas presentes en la proteína nativa, que se liberan tras un proceso de hidrólisis enzimática, fermentación o digestión gastrointestinal (Peighambardoust et al., 2021). Una vez liberadas, estas secuencias de péptidos bioactivos pueden ejercer distintas actividades biológicas en el organismo, que tendrán un efecto sobre la salud humana y la prevención de enfermedades. Estos péptidos bioactivos están constituidos generalmente por subunidades de 2 a 20 aminoácidos, con un peso molecular inferior a 3 kDa (Görgüç et al., 2020). Desde su descubrimiento, en 1979, se han descrito péptidos derivados de proteínas alimentarias con diferentes actividades biológicas como anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana, antitrombótica, antihipertensiva, antidiabética, opioide, inmunomoduladora e hipocolesterolémica (Pérez-Gregorio et al., 2020). Diferentes factores como las condiciones de hidrólisis, la relación

enzima-sustrato, la temperatura, el pH, la fuente proteica original, o el tipo de enzima, determinan la eficacia del proceso de hidrólisis y el tipo de péptidos resultantes (Karami & Akbari-Adergani, 2019).

Ante el creciente interés mencionado previamente en la búsqueda de compuestos antioxidantes de origen alimentario para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, y teniendo en cuenta la tendencia al alza del consumo de dietas basadas en plantas, son cada vez más frecuentes las investigaciones que utilizan proteínas de origen vegetal como fuente de péptidos bioactivos, especialmente con actividad antioxidante, por su bajo coste, alta actividad biológica y fácil absorción (Samtiya et al., 2021).

#### **1.4.2. La quinua como alimento funcional**

Entre los alimentos de origen vegetal, en los últimos años se ha despertado un gran interés por los pseudocereales. Los pseudocereales son granos con una estructura y composición nutricional similar a los cereales y las legumbres, sin embargo, no pertenecen a la familia de las gramíneas. Este grupo de vegetales ha formado parte de la dieta de diferentes civilizaciones de América del Sur desde hace siglos, si bien fueron desplazados tras la introducción de cereales como el trigo, el arroz y el maíz. Entre los pseudocereales, destaca especialmente la quinua (*Chenopodium quinoa Wild.*), una planta característica de la región de los Andes cuyo cultivo data desde hace más de 7000 años (Angeli et al., 2020). En la década de los años 90, la Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio (NASA, por sus siglas en inglés: *National Aeronautics and Space Administration*) clasificó a la quinua como uno de los cultivos emergentes con excelentes propiedades nutricionales para su empleo en misiones de larga duración (Schlick Moffettfield & Bubenheim, 1996). Además, la FAO declaró 2013 como el Año Internacional de la Quinua, por sus características nutricionales, versatilidad agronómica y contribución frente a la inseguridad alimentaria (FAO, 2011a).

El modelo agroalimentario actual constituye unas de las principales causas de la degradación medioambiental, así como de la destrucción de multitud de recursos naturales, de la deforestación y de la pérdida de biodiversidad. El sistema de producción alimentario actual es responsable de entre el 20 y el 35% de las emisiones totales de efecto invernadero y de un elevado consumo del agua presente en el planeta (FAO & WHO, 2019). Tal es la importancia de este asunto que entre los Objetivos para el Desarrollo Sostenible (ODS), de

la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, se remarca la necesidad de priorizar aquellos sistemas alimentarios sostenibles para satisfacer las necesidades nutricionales de una población mundial en continuo crecimiento (United Nations General Assembly, 2015; Lee et al., 2016). En este escenario, la quinua se presenta como un cultivo con una elevada resiliencia a condiciones ambientales extremas, adaptándose a diferentes condiciones de altitud, temperatura, precipitación y suelo (Melini & Melini, 2021). Además, este pseudocereal exhibe un uso eficiente del agua y una resistencia a la falta de humedad del suelo, lo que permite su desarrollo en climas extremos (FAO, 2011b). Esta gran adaptabilidad al entorno se debe, entre otros factores, a los depósitos de oxalato cálcico presentes en sus hojas, que permiten a la planta retener la humedad, lo que supone una mejor tolerancia a periodos de sequía (Spehar, 2006). Esta gran resistencia al estrés abiótico ha hecho que el Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal de Bolivia (INIAF) haya incluido a la quinua entre las semillas con mayor resistencia al cambio climático (Matijasevic Mostajo, 2014). Sin embargo, a pesar de la sostenibilidad de este cultivo, la realidad es que la popularidad de este pseudocereal en los últimos años ha supuesto un incremento del riesgo de inseguridad alimentaria en los países productores, así como el deterioro de la biodiversidad y la calidad del suelo debido a la intensificación y mecanización del cultivo (Jacobsen, 2011; Ruiz et al., 2014). Por ello, es necesaria la diversificación de la producción de quinua para reducir la presión medioambiental en las regiones de origen. De hecho, en la actualidad España se ha convertido en el principal productor de quinua en Europa con una extensión de cultivo superior a las 1.700 hectáreas, destacando la producción en Andalucía (Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries (CBI), 2020).

En cuanto a su valor nutricional, aunque su aporte en los diferentes macronutrientes se asemeja a los cereales y las legumbres, la quinua destaca por su alto contenido en proteínas de elevado valor biológico, siendo así uno de los pocos alimentos vegetales que posee todos los aminoácidos esenciales para el ser humano en una cantidad adecuada (Dakhili et al., 2019b) (Tabla 4). Además, la digestibilidad de sus proteínas es elevada, ya que ha presentado una fracción absorbible superior al 91% en estudios realizados en animales, debido en parte a su bajo contenido en inhibidores de tripsina que limitan la digestión enzimática y la absorción proteica (Graf et al., 2015). La fracción proteica de la quinua representa el 14% del peso total en seco y está constituida mayoritariamente por albúminas y globulinas en un 44% y un 77%, respectivamente, mientras que las prolaminas representan una proporción minoritaria e incluso inexistente en algunas variedades (BEDCA, 2010). Por ello, la quinua

es considerada un alimento libre de gluten y apto para el consumo en individuos que presentan celiaquía, enfermedad en la que los individuos afectados manifiestan una intolerancia a la ingesta de esta proteína, y que les provoca una afección autoinmune que daña al revestimiento del intestino delgado ocasionando problemas digestivos más o menos graves en los individuos que la padecen (Niro et al., 2019).

**Tabla 4:** Composición en aminoácidos esenciales de diferentes fuentes proteicas de origen vegetal y de origen animal; Contenido expresado en gramos aminoácidos / 100g proteína (Dakhili et al., 2019a; Khazaei et al., 2019; Liu et al., 2019).

(g /100 g Proteína)	Proteína vegetal					Proteína animal		
	Pseudocereal	Cereales		Legumbres		Caseína	Suero lácteo	Huevo
	Quinoa	Trigo	Arroz	Lenteja	Soja			
<b>Histidina</b>	2,9	2,3	2,1	2,4	2,5	3,1	1,6	2,5
<b>Leucina</b>	5,9	6,8	8,2	7,2	5,6	10,2	12,1	8,6
<b>Isoleucina</b>	3,6	3,6	4,1	4,1	4,9	5,9	7,4	5,3
<b>Lisina</b>	5,4	2,7	3,8	6,7	5,6	8,5	10,9	7,3
<b>Metionina</b>	3,6	4,2	3,6	0,9	1,4	2,9	2,5	3,1
<b>Fenilalanina</b>	6,1	7,8	10,5	5,0	5,5	5,5	3,8	5,4
<b>Treonina</b>	3,0	2,9	3,8	3,7	3,9	4,6	8,8	4,4
<b>Valina</b>	4,2	4,4	6,1	4,7	5,1	7,6	6,9	6,8
<b>Triptófano</b>	1,2	1,3	1,1	0,8	1,3	1,4	1,7	1,3

El macronutriente predominante en la quinua son los hidratos de carbono ya que constituyen entre el 60% y el 80% del peso en seco del pseudocereal. En concreto, el almidón es el principal hidrato de carbono presente en la quinua (58-64%), seguido por la fibra dietética (14-20%) lo que supone un aporte superior al de otras matrices de cereales como el arroz o el maíz (Martínez-Villaluenga et al., 2020) (Tabla 5). El contenido de fibra presente en la quinua es mayoritariamente de tipo insoluble en un rango del 10-14%, mientras que la



fibra de tipo soluble representa un 4-6% (Sobota et al., 2020). En los últimos años, los polisacáridos hidrosolubles y digeribles procedentes de la quinua también se han evaluado por sus potenciales propiedades funcionales. Recientemente se ha descrito que los polisacáridos constituidos por manosa y glucosa presentes en la quinua pueden ejercer un efecto inhibitorio en la diferenciación de una línea celular de pre-adipocitos conocida como 3T3-L1, lo que sugiere una acción anti-obesogénica (Teng et al., 2020). En lo que respecta al contenido lipídico (6%), la quinua se caracteriza por un elevado aporte en ácidos grasos insaturados en un rango del 70-89% y con un ratio ácidos grasos insaturados/saturados superior al de cereales como el trigo (Alvarez-Jubete et al., 2009; Gordillo-Bastilla, 2016). Además, a pesar del alto grado de insaturaciones, las grasas de la quinua poseen una gran estabilidad debido a la presencia de tocoferoles y otros antioxidantes naturales (Diaz Valencia et al., 2018).

**Tabla 5:** Valor nutricional de diferentes alimentos de origen vegetal y animal; Contenido expresado por 100g/producto (BEDCA, 2010).

(g /100 g producto)		<u>Hidratos de carbono</u> (g)	<u>Fibra</u> (g)	<u>Proteínas</u> (g)	<u>Lípidos</u> (g)	<u>Ratio Grasa insaturada/saturada</u>	
<i>Proteína vegetal</i>	<i>Pseudocereal</i>	<i>Quinua</i>	49	17	14	6	7
	<i>Cereales</i>	<i>Trigo</i>	61	10	12	2	4
		<i>Arroz</i>	86	0	7	1	3
	<i>Legumbres</i>	<i>Lenteja</i>	49	10	25	1	4
		<i>Soja</i>	9	16	36	19	5
<i>Proteína animal</i>	<i>Leche</i>		5	0	3	4	0,5
	<i>Huevo</i>		0	0	13	11	1,8

La quinua representa, además, una fuente importante de vitaminas y minerales esenciales para el organismo. Este pseudocereal contiene una cantidad de calcio, hierro, magnesio, cobre y zinc superior al de la mayoría de cereales como el trigo o el arroz (Filho et al., 2017) (Tabla 6). En lo que respecta al aporte en vitaminas, la quinua constituye una fuente importante de alfa-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), tiamina

(Vitamina B1), riboflavina (Vitamina B2) y ácido fólico (Vitamina B9) (Johnson et al., 2019). Además, han sido identificados otros compuestos minoritarios como es el caso de los compuestos fenólicos, saponinas o fitoecdisteroides. Por este motivo, diferentes estudios han descrito que la quinua posee una mayor actividad antioxidante y unos niveles de compuestos fenólicos superiores al de otras semillas, y se ha sugerido que el aumento en la ingesta de este pseudocereal podría ejercer efectos fisiológicos beneficiosos sobre la salud (Ng & Wang, 2021).

**Tabla 6.** Aporte de minerales en alimentos de origen vegetal y animal; contenido expresado por 100g/producto. CDR: Cantidad diaria recomendada (BEDCA, 2010).

		Calcio (Mg)	Fósforo (Mg)	Magnesio (mg)	Hierro (mg)	Potasio (mg)	Zinc (mg)	
CDR		800	700	375	14	200	10	
Proteína vegetal	Pseudocereal	Quinua	79	230	210	8	780	3
	Cereales	Trigo	44	344	147	3	421	4
		Arroz	10	100	13	1	110	0,2
		Lenteja	57	256	74	7	463	4
	Legumbres	Soja	197	194	65	4	620	1
Proteína animal	Leche	124	92	12	0,1	157	0,4	
	Huevo	57	200	12	2	130	1	

### 1.4.3. Hidrolizados de proteínas y péptidos bioactivos derivados de quinua

Recientemente, los pseudocereales y especialmente la quinua han sido utilizados para la obtención de hidrolizados de proteínas con actividad biológica (Piñuel et al., 2019; Shi et al., 2019; Mudgil et al., 2020). El proceso de hidrólisis enzimática de las proteínas de quinua permite la liberación de péptidos con un menor peso molecular que han evidenciado numerosas actividades biológicas, entre las que destacan la actividad antioxidante y la antihipertensiva (Morales et al., 2020). Los péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis de quinua han demostrado ejercer actividad antihipertensiva a través de la inhibición de la ECA y actividad antidiabética mediada por la inhibición de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) y de la alfa-glucosidasa (Mudgil et al., 2020). De igual forma, diferentes estudios han mostrado mejoras de las propiedades tecnofuncionales de la quinua como consecuencia del proceso de hidrólisis enzimática. Daliri et al. (2021), constataron cómo un hidrolizado de proteínas de quinua con papaína ocasionó un incremento de la actividad antioxidante y de las propiedades espumantes, de emulsificación y de solubilidad asociadas a la ruptura de la estructura

proteica nativa. De forma similar, la hidrólisis enzimática con papaína de la fracción proteica de la quinua produjo una mejora de las propiedades tecnológicas, especialmente de la capacidad espumante, en el hidrolizado resultante (Quelal et al., 2019). En ese mismo trabajo se observó además un incremento en la digestibilidad de la proteína (88% del hidrolizado de quinua vs. 78% de la proteína de quinua), así como del PDCAAS (64% del hidrolizado de quinua vs. 36% de la proteína de quinua).

Por todo ello, y considerando el valor nutricional de este pseudocereal, especialmente por su contenido en proteínas de alto valor biológico, y considerando la demanda de la población de un mayor consumo de alimentos de origen vegetal, la quinua emerge como una alternativa saludable y sostenible para la obtención de alimentos funcionales y una nueva opción frente al consumo de productos de origen animal.

## 2. Hipótesis y Objetivo

Teniendo en cuenta los argumentos expuestos en la Introducción, nuestra **hipótesis** de trabajo se basó en que el consumo de hidrolizados de proteínas de origen vegetal con propiedades antioxidantes, podrían ser de gran utilidad para prevenir y/o mejorar el estrés oxidativo y algunas ECNT asociadas a esta condición, como es el caso de la HTA.

El **objetivo global** de esta Tesis Doctoral fue la obtención y desarrollo de hidrolizados de proteínas derivados de quinua con actividad antioxidante *in vitro* y buen perfil sensorial, y evaluar *in vivo* el efecto beneficioso que ocasiona su administración frente el estrés oxidativo y/o sobre el desarrollo de HTA, así como investigar los posibles mecanismos de acción implicados en su actividad biológica.

Para conseguir el objetivo propuesto se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

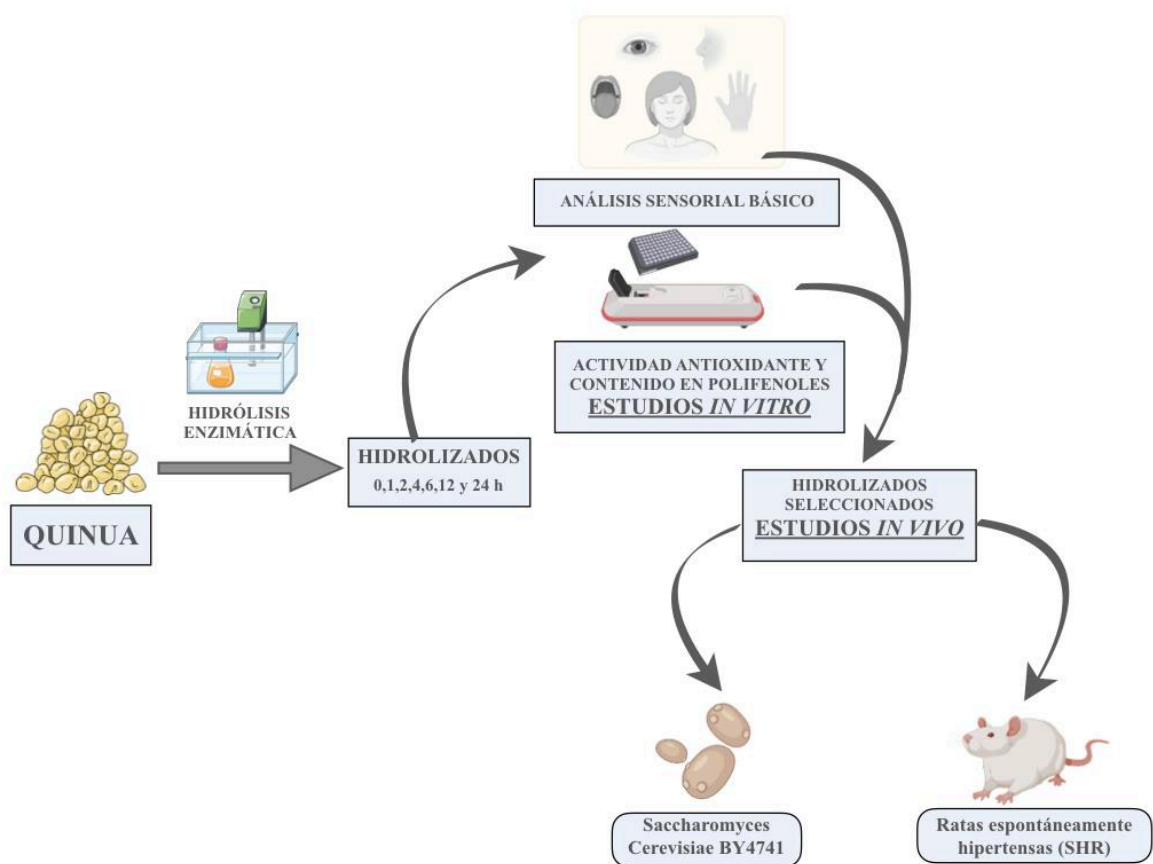
- a) Obtención de hidrolizados con diferentes enzimas de grado alimentario a partir de tres variedades de quinua: blanca, roja y negra.
- b) Análisis del perfil sensorial básico de los hidrolizados de quinua obtenidos.
- c) Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados de quinua obtenidos.
- d) Selección del hidrolizado de quinua más prometedor que presente una óptima relación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el perfil sensorial.
- e) Efecto del hidrolizado de quinua seleccionado sobre el estrés oxidativo empleando *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 como organismo modelo.
- f) Efecto del hidrolizado de quinua seleccionado en un modelo experimental de HTA, la rata SHR.
- g) Análisis de biomarcadores que permitan dilucidar el/los mecanismo/s de acción implicados en el efecto biológico ocasionado tras la administración del hidrolizado de quinua seleccionado en las ratas SHR.

### 3. Material y Métodos

La línea de desarrollo principal de esta Tesis Doctoral se basó en la obtención de hidrolizados de quinua de tres variedades distintas: blanca, roja y negra, utilizando diferentes enzimas de grado alimentario. Con el fin de seleccionar el hidrolizado más prometedor tanto a nivel sensorial como funcional, en primer lugar, se llevó a cabo una evaluación sensorial básica para descartar aquellos hidrolizados con propiedades sensoriales extrañas o desagradables. En paralelo a la evaluación sensorial, se evaluó en los hidrolizados la actividad antioxidante *in vitro*, a través del método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), y se cuantificaron los polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, con el objetivo de dilucidar si las propiedades antioxidantes observadas en los hidrolizados desarrollados se relacionaban no solo con la liberación de péptidos bioactivos sino también con la liberación de compuestos fenólicos que pudiera ocasionar el proceso de hidrólisis enzimática. Tras el estudio sensorial y funcional *in vitro*, se seleccionó el hidrolizado más prometedor, en el cual se evaluó su actividad antioxidante *in vivo* utilizando como organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. En este estudio se evaluó la capacidad del hidrolizado de quinua seleccionado para inhibir el estrés oxidativo provocado en la célula mediante la incorporación de un agente oxidante (peróxido de hidrógeno). Se evaluaron para ello diferentes parámetros de crecimiento y se comparó el efecto antioxidante del hidrolizado de quinua, con el efecto ocasionado por otros antioxidantes de referencia como la vitamina C y el resveratrol.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el hidrolizado seleccionado tras la evaluación de su actividad antioxidante *in vivo*, se decidió evaluar si las propiedades antioxidantes del hidrolizado seleccionado podrían mejorar el estrés oxidativo asociado a la enfermedad cardiovascular y, concretamente, si actuarían ejerciendo un efecto protector sobre la HTA y sus complicaciones asociadas. Para ello, se evaluó el efecto del consumo del hidrolizado de quinua seleccionado en un modelo animal de HTA de origen genético, la rata SHR. En concreto, el hidrolizado de quinua seleccionado se administró por vía oral en el agua de bebida durante 8 semanas, periodo durante el cual se registraron semanalmente diferentes parámetros como el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida. También se evaluó la presencia o desarrollo de neuropatía periférica en la semana

inicial, en la semana 5 y al finalizar el estudio. Además, tanto al inicio como al finalizar el periodo experimental se midió la PAS de los animales mediante un método no invasivo. Transcurridas las 8 semanas de estudio, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de sangre, de heces y de los diferentes órganos de interés con la finalidad de realizar distintos ensayos para intentar dilucidar los posibles mecanismos de acción implicados en el efecto del hidrolizado sobre este modelo experimental. Los resultados se contrastaron con los obtenidos tras la administración de vitamina C, y también se evaluó y comparó el efecto de los distintos tratamientos con sus controles normotensos, las ratas WKY. La figura 4 muestra un esquema del plan de trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral.



**Figura 4.** Esquema general del procedimiento realizado para la obtención y evaluación de hidrolizados de quinua con potencial antioxidante

### 3.1. Obtención de hidrolizados de quinua

Para la obtención de los hidrolizados se utilizaron distintas variedades de quinua, blanca, roja y negra (Naturquinua, España). Las semillas de quinua se molieron en un molino

de piedra (Conasi, España) y se diluyeron en agua destilada en una proporción 1:12,5 (w/v). El proceso de hidrólisis de las diferentes muestras de quinua se llevó a cabo utilizando enzimas de distintos orígenes (digestivo, vegetal, fúngico y bacteriano), todas ellas de grado alimentario.

Las enzimas utilizadas, su denominación comercial y su procedencia se detallan a continuación:

- **ALCALASE 2.4 LFG:** Subtilisina (E.C. 3.4.21.62) 2.4 AU-A/g procedente de *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Dinamarca).
- **BC PEPSIN 1:3000** Pepsina (E.C 3.4.23.1) procedente de estómago de cerdo (Biocatalysts, Reino Unido).
- **PROMOD 11P 100TU:** Papaína (E.C.3.4.22.2) procedente de *Carica papaya* (Biocatalysts, Reino Unido).
- **FLAVORPRO 786P:** procedente de *Bacillus sp.* y *Carica papaya* (Biocatalysts, Reino Unido).
- **FLAVORPRO 795MDP:** Aminopeptidasa y glutaminasa procedente de fuentes mixtas (bacteriana y fúngica) (Biocatalysts, Reino Unido).
- **FLAVORPRO 373MDP:** Caseína proteasa procedente de *Bacillus subtilis* (Biocatalysts, Reino Unido).
- **PROMOD 950L:** Caseína proteasa de origen microbiano (Biocatalysts, Reino Unido).
- **PROMOD 279P:** Proteasa procedente de *Aspergillus oryzae* (Biocatalysts, Reino Unido).
- **PROMOD 24P:** Caseína proteasa procedente de *Bacillus subtilis* (Biocatalysts, Reino Unido).
- **FLAVORPRO 750MDP:** Caseína proteasa procedente de *Aspergillus sp.* (Biocatalysts, Reino Unido).

Las condiciones de hidrólisis utilizadas para cada enzima, acorde a las especificaciones del fabricante, aparecen reflejadas en la siguiente tabla (Tabla 7).

**Tabla 7.** Parámetros empleados para la obtención de hidrolizados de quinua con diferentes enzimas de grado alimentario.

<i>Parámetros</i>	<i>BC Pepsin</i>	<i>Promod 144 P</i>	<i>Flavopro 786 MDP</i>	<i>Flavopro 795 MDP</i>	<i>Flavopro 373 MDP</i>	<i>Promod 950 L</i>	<i>Promod 279 P</i>	<i>Promod 24 P</i>	<i>Promod 750 MDP</i>	<i>Alcalasa</i>
<b>Abreviatura</b>	BCP	144P	786M	795M	373M	950L	279P	24P	750M	ALC
<b>Origen</b>	Digestivo	Vegetal	Bacteriano y fúngico	Bacteriano y fúngico	Bacteriano	Microbiano	Fúngico	Bacteriano	Fúngico	Digestivo
<b>pH</b>	2	5,0-7,5	6,0-7,5	5,0-7,5	6,0-8,0	5,0-7,0	4,0-6,0	5,0-7,0	5,5-7,5	7,0-9,0
<b>Temperatura</b>	38 °C	50-70 °C	50°C	45-55 °C	55-60 °C	50-60 °C	50°C	40-60 °C	45-55 °C	30-65 °C
<b>Concentración (E/S)</b>	2:100 (p/p)	Un rango de act > a 700 Papaina TU	2:100 (p/p)	357 Leucina aminopeptidasa u/g 6,0 Glutaminasa u/g	Caseína proteasa 90 u/g	154 Caseína proteasa units/g	2:100 (p/p)	Proteasa 140 u/g (Caseína como sustrato)	55 u/g Caseína Proteasa	2:100 (p/p)
<b>Inactivación</b>	> pH 7 NaOH	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min	> Ta 90 °C 10 min



Para llevar a cabo las diferentes hidrólisis enzimáticas se utilizó un baño termostático con agitación que permitió mantener la temperatura óptima de actuación de cada enzima durante 24 horas. Durante el proceso de hidrólisis se recogieron alícuotas a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6 y 24 horas). Cada una de las alícuotas se inactivó mediante calentamiento a una temperatura superior a los 90°C, durante 15 minutos, excepto la pepsina, que se inactivó incrementando el pH por encima de 7 con NaOH 1N de grado alimentario. A continuación, los hidrolizados se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a – 20°C hasta su análisis.

### **3.2. Análisis sensorial básico**

En esta Tesis Doctoral se realizaron una serie de análisis sensoriales básicos con el objetivo de descartar aquellos hidrolizados con propiedades sensoriales extrañas o desagradables, e ir seleccionando los hidrolizados o muestras con unas propiedades organolépticas potencialmente aceptables por los consumidores. La evaluación sensorial de las muestras se llevó a cabo por un panel de cata interno del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), y en todos los casos los análisis fueron evaluados por un panel de entre 10-12 personas. Se evaluaron principalmente aspectos organolépticos básicos (aparición, color, olor, textura y sabor) para hacer una primera clasificación discriminatoria de los productos obtenidos, y se descartaron aquellos que presentaban sabores, olores y/o texturas extrañas o desagradables.

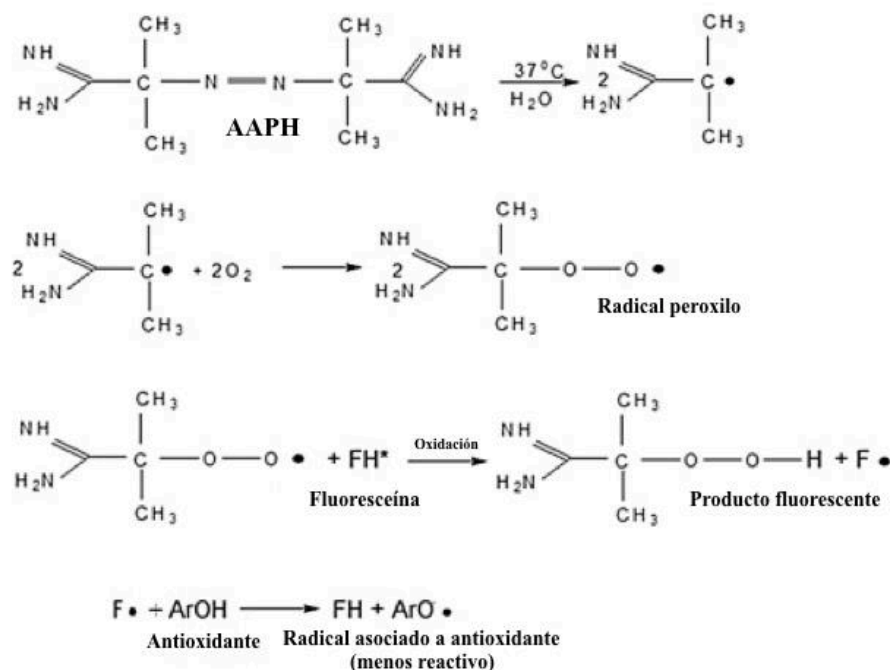
### **3.3. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro***

#### **3.3.1. Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno**

En paralelo a la evaluación sensorial básica, y en cada uno de los hidrolizados obtenidos con las diferentes variedades de quinua, las diferentes enzimas de grado alimentario y a distintos tiempos de hidrólisis, se determinó la actividad antioxidante *in vitro*.

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó mediante el ensayo ORAC. Este protocolo se llevó a cabo acorde al procedimiento previamente descrito por Garcés-Rimón et al., (2016). El ensayo ORAC mide la capacidad de los compuestos antioxidantes

presentes en una muestra para neutralizar los radicales peroxilo, derivados de la descomposición térmica del azobis (2-metilpropionamidina) diclorato (AAPH), y que desencadenan la oxidación de la fluoresceína utilizada como sustrato (Figura 5). El antioxidante de referencia empleado fue un análogo soluble de la vitamina E, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (trolox).



**Figura 5.** Esquema representativo del proceso de oxidación de la fluoresceína por los radicales peroxilo y neutralización por parte de los compuestos antioxidantes (Litescu et al., 2014).

Las muestras, el trolox, el AAPH y la fluoresceína se diluyeron en tampón fosfato salino (75 mM; pH 7,4) preparado previamente. La curva de calibrado de referencia se realizó diariamente con diferentes concentraciones de trolox (0,2 – 2 nmol). La solución stock de fluoresceína (1,17 mM) se elaboró diariamente con el mismo tampón, y se almacenó en oscuridad a 4°C. La reacción se realizó en placas multipocillo de poliesterieno negras (Nunc, Dinamarca) con un volumen final de 200 µl de la siguiente forma: 20 µl de la muestra/recta de calibrado, 120 µl de fluoresceína y 60 µl de APPH. La mezcla obtenida se incubó durante 10 minutos. A continuación, se midió la fluorescencia resultante de la reacción de forma continua durante 95 minutos a 37°C usando un fluorímetro (FLUOstar

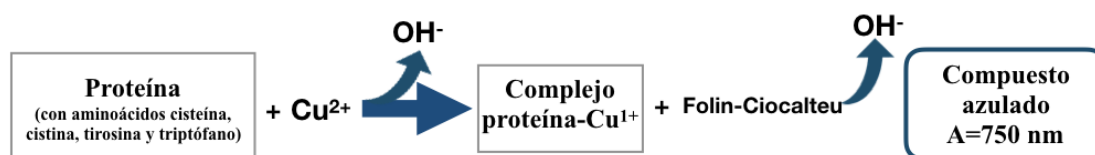
OPTIMA, Labtech, Reino Unido), con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Tomando en consideración las curvas normalizadas se cuantificó el área bajo la curva (AUC, por las siglas en inglés: *Area Under Curve*) de descenso de fluorescencia para cada pocillo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

Donde  $f_0$  corresponde al valor de lectura de la fluorescencia inicial y  $f_i$  a la lectura de fluorescencia transcurridos  $i$  minutos.

Los valores de fluorescencia fueron obtenidos como el promedio de al menos tres ensayos independientes para cada muestra realizada por triplicado. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox (ET)/mg de proteína.

Para determinar la concentración de proteína presente en cada muestra se llevó a cabo el método de Lowry (Lowry et al., 1951) modificado por Peterson (1979), y para ello se empleó el ensayo diagnóstico de Biorad (DC protein assay, Biorad, Estados Unidos), que utiliza albúmina sérica bovina como estándar. Este protocolo se fundamenta en la reacción en medio alcalino del  $\text{Cu}^{2+}$  con la proteína presente en la muestra, lo que desencadena la reducción del reactivo de Folin y el cambio de una tonalidad amarilla característica, a un tono azulado con una absorbancia máxima de 750 nm. El cambio de tonalidad se debe a la presencia de aminoácidos específicos como son la tirosina y el triptófano y, en menor medida, por la cisteína, la cistina y la histidina (Figura 6).



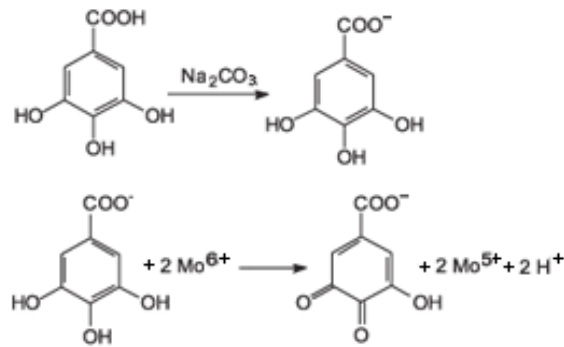
**Figura 6.** Esquema representativo de la reacción del método de Lowry (Olson & Markwell, 2007).

La curva de calibrado se construyó con seroalbúmina bovina a diferentes concentraciones (0,05-0,5mg/ml) siguiendo las indicaciones del fabricante. En una placa multipocillo de poliestireno transparente (Nunc, Dinamarca) se incorporaron 20  $\mu\text{l}$  de la muestra diluida o estándar, 20  $\mu\text{l}$  del reactivo A' resultante de la combinación en una proporción 100:2 del reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y S (sustancia

surfactante), y 160  $\mu\text{l}$  del reactivo B (1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio o reactivo de Folin). Transcurrido un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se procedió a la medición de la absorbancia a 750 nm en un lector de placas Biotek PowerWave™ XS (BioTek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos). Las muestras se realizaron por duplicado y, al menos, en tres ensayos independientes. Los resultados se expresaron en mg de proteína/ $\mu\text{l}$ .

### **3.3.2. Determinación de los compuestos fenólicos totales.**

La valoración del contenido de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo de acuerdo al método colorímetro Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Este método se basa en la reacción a pH básico del reactivo de Folin-Ciocalteu con los compuestos fenólicos presentes en la muestra de estudio, que forma complejos molibdeno-tungsteno con una tonalidad azul característica. Esto se debe a que el reactivo de Folin-Ciocalteu contiene ácido fosfomolibdóbúngstico y tungstato sódico, que tras su reducción por los grupos fenólicos sufre un cambio de color amarillo a un azul intenso (Figura 7). El ácido gálico a diferentes concentraciones (50-1500  $\mu\text{M}$ ) se empleó para la elaboración de la curva de calibrado de referencia. La reacción de reducción se realizó en una placa multipocillo de poliestireno transparente (Nunc, Dinamarca) con un volumen final de 260  $\mu\text{L}$ : 24  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar de ácido gálico, 47  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu a una concentración del 10% y 189  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (700 mM). A continuación, se midió la absorbancia a 765 nm usando un lector de placas Biotek PowerWave™ XS (BioTek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos). El contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó a partir de la curva calibrado con ácido gálico, y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de hidrolizado.

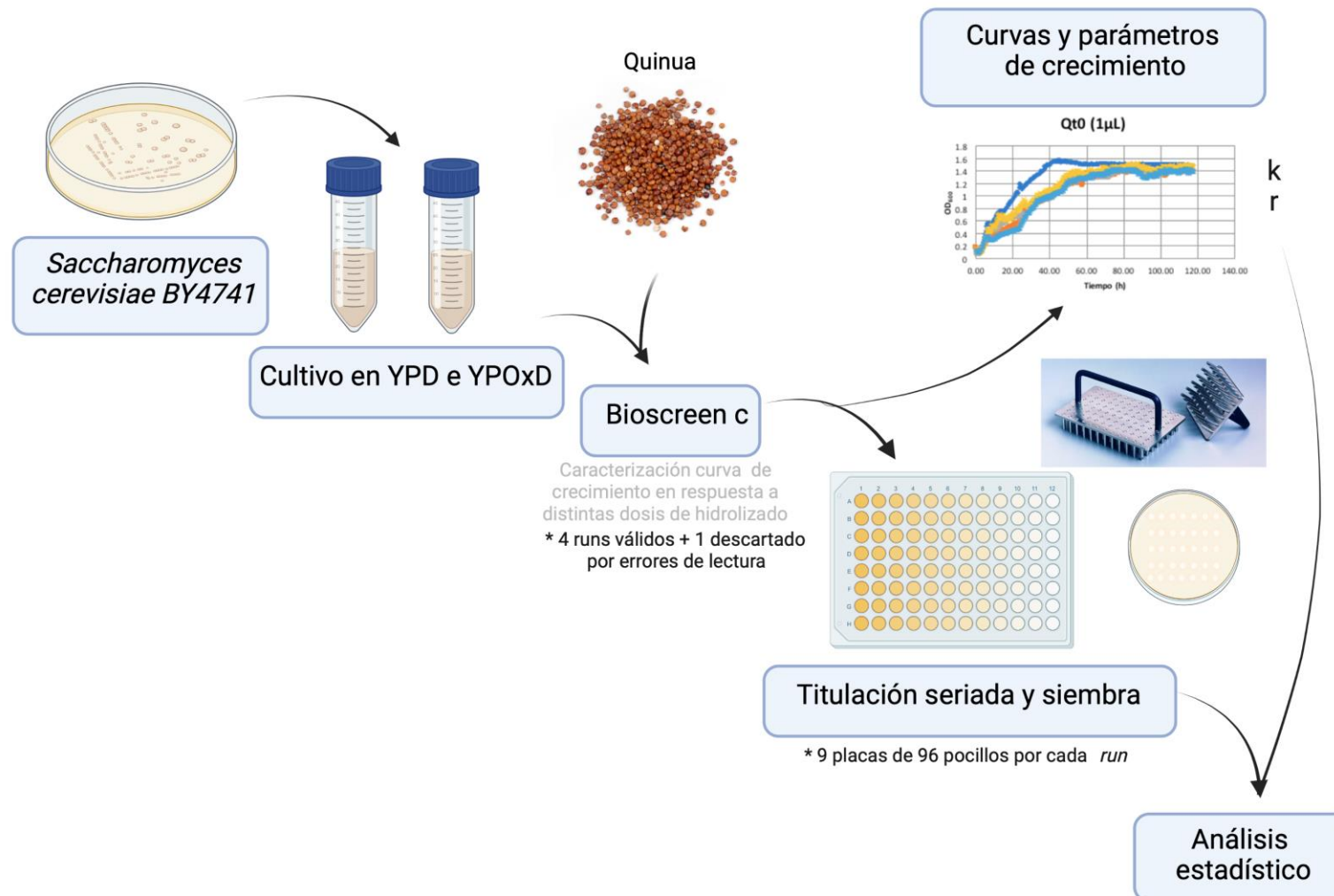


**Figura 7.** Esquema representativo del método de Folin-Ciocalteu (Martono et al., 2019).

### 3.4. Estudio de la capacidad antioxidante *in vivo* del hidrolizado de quinua

#### 3.4.1. Protocolo general del estudio en *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

Para evaluar la actividad antioxidante *in vivo* se utilizó como modelo experimental *Saccharomyces cerevisiae* expuesto a un agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), siguiendo el esquema general de la Figura 8. Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC) en el laboratorio de la Dra. Beatriz Sabater.

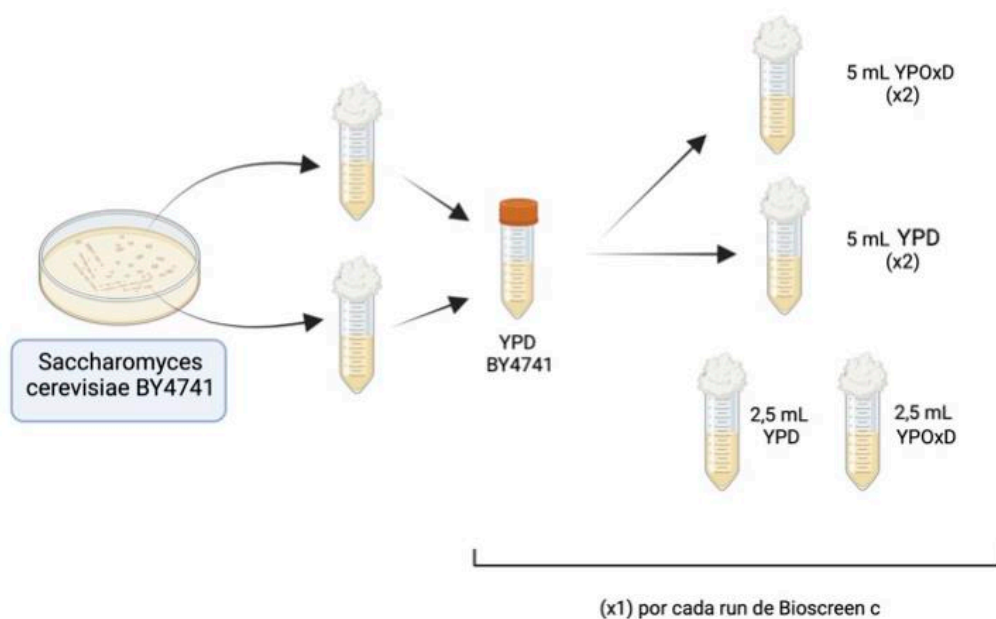


**Figura 8.** Esquema del ensayo *in vivo* para evaluar la actividad antioxidante del hidrolizado de quinua tras la exposición de *Saccharomyces cerevisiae* a estrés oxidante.

### 3.4.2. Medios de cultivo e inducción de estrés oxidante

En primer lugar, se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de glicerizados de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (derivada de S288C; con genotipo MATa, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met5 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0) en placas de Petri con medio YPD agar (1% extracto levadura, 2% lacto-peptona, 2% glucosa y 1,5% agar bacteriológica). Las placas se incubaron a 28° C durante 24-48 horas, para posteriormente inocular una de las colonias desarrolladas en 2 tubos Falcon de 50 mL con 5 mL de medio YPD (1% extracto levadura, 2% bacto-peptona, 2% glucosa). Además, se puso otro tubo Falcon sin inocular con 2,5 mL de medio YPD utilizado como control negativo. A continuación, todos los tubos se incubaron a 190 rpm, 28° C durante 24 horas.

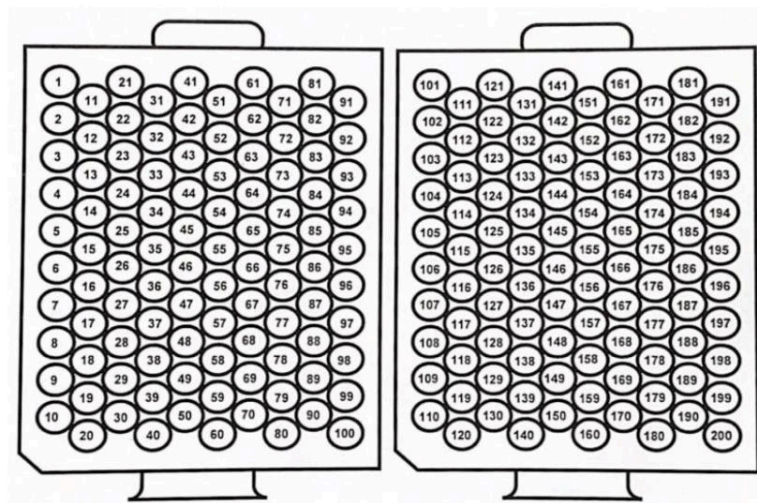
A partir de este pre-cultivo se realizaron cultivos por duplicado de 100  $\mu\text{L}$  del pre-cultivo con 5 mL del medio YPD o YPOxD (1% extracto levadura, 2% lacto-peptona, 1% glucosa y 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En el caso de los controles negativos, se emplearon 2,5 mL del cultivo YDP o YPOxD. La inducción del estrés oxidativo tuvo lugar en el medio YPOxD, ya que contenía  $\text{H}_2\text{O}_2$ , un agente altamente oxidante (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema de preparación de los pre-cultivos bajo la acción del agente oxidante.

### 3.4.3. Determinación de parámetros relativos a las curvas de crecimiento

El Bioscreen c (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finlandia) es un lector fotométrico de absorbancia que permite evaluar la densidad óptica (OD) de un microcultivo de forma continua y a gran escala. Para esta determinación se utilizaron unas placas específicas denominadas Honeycomb de 10x10 pocillos con un volumen máximo de 400 $\mu$ L, lo que permite testar 200 muestras de forma simultánea, ya que este equipo permite usar 2 placas en cada ensayo (Figura 10).



**Figura 10.** Distribución de pocillos en placas Honeycomb para Bioscreen c (OY Growth Curves Ab Ltd, 2017).

En los cultivos sometidos a estrés oxidante se prepararon diluciones en medio YPOxD hasta alcanzar un volumen de 180  $\mu$ L por pocillo con una OD<sub>600</sub> inicial de  $\sim 0,1$ . A continuación, se adicionaron 180  $\mu$ L del cultivo diluido previamente en cada pocillo junto al volumen establecido para el hidrolizado de quinua, de los antioxidantes de referencia (vitamina C o resveratrol), de los controles negativos (medios sin inocular: YPD, YPOxD, YPOxD + metanol, YPOxD + PBS) o del control cultivado bajo estrés (BY4741 en: YPOxD en YPD; YPOxD en YPOxD + metanol; YPOxD en YPOxD + PBS). En el caso del hidrolizado de quinua se testaron 4 dosis (1  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L y 20  $\mu$ L) con al menos 5 repeticiones (réplicas técnicas), mientras que para los antioxidantes con actividad conocida se emplearon 2 dosis (2  $\mu$ L y 10  $\mu$ L) con al menos 7 repeticiones. Además, en cada ensayo se incluyeron los correspondientes controles negativos y los controles de cultivo bajo estrés, con al menos 3 repeticiones cada uno. La lectura se realizó empleando un filtro de

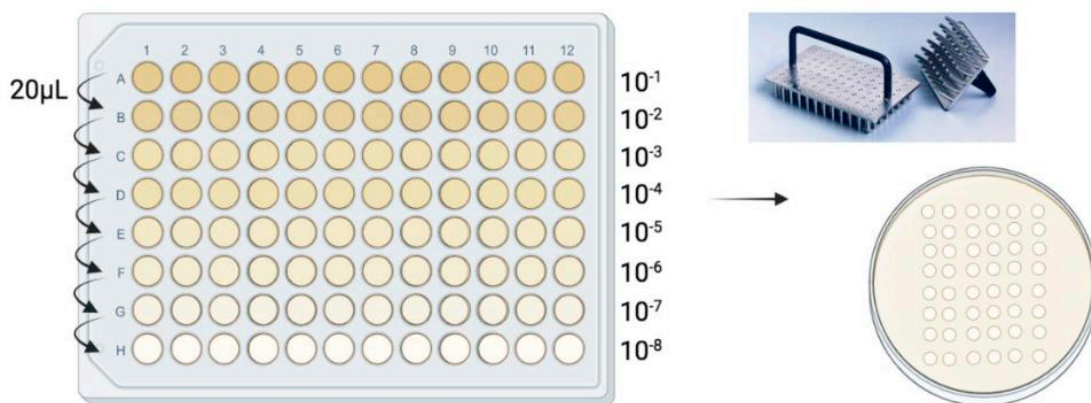


600 nm con mediciones de la OD<sub>600</sub> cada 15 minutos durante 4-5 días ± 1 hora, a 28-29 °C, y con agitación alta y continua.

Tras la obtención de los datos de la OD<sub>600</sub> se cuantificaron los parámetros tasa de crecimiento (r) y capacidad de carga (k) del sistema, empleando la librería Growthcurver v.0.3.1 en RStudio v. 1.4.1106 (Sprouffske & Wagner, 2016). Esta librería permite incorporar los datos obtenidos de la OD<sub>600</sub> a un modelo de crecimiento logarítmico, a partir del cual se determinan los parámetros que definen la curva de crecimiento como r y k.

#### 3.4.4. Recuento de viables

La determinación de las unidades formadoras de colonias (UFCs) se llevó a cabo realizando diluciones seriadas de cada una de las muestras testadas en placas estériles de 96 pocillos. Para ello se dispensaron 180 µL de glicerol estéril al 10% y 20 µL del cultivo de la placa Honeycomb sobre la primera línea (A, Figura 10), a partir de la cual se procedió a realizar diluciones seriadas transfiriendo 20 µL de cada fila a la siguiente con una pipeta automática de 8 canales (Eppendorf Xplorer® plus). Posteriormente se titularon en placas YPDagar, depositando 1,65 µL de cada pocillo sobre una placa de Petri (90x15 mm) con un replicador de 8x6 pines (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (Figura 11). El replicador se esterilizó por flambeado con etanol 96° previamente a cada transferencia, y se llevaron a cabo tres réplicas técnicas de cada dilución seriada.



**Figura 11.** Esquema del procedimiento empleado para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs).

Tras la inoculación, las placas Petri se incubaron durante 48 horas a 28°C y se realizó el recuento de viables siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{UFC}/\mu\text{L} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ colonias por zona} \cdot \text{factor de dilución}}{1,65 \mu\text{L de la muestra sembrada}}$$

### 3.5. Efecto del hidrolizado de quinua en un modelo experimental de HTA

#### 3.5.1. Protocolo general del estudio en ratas espontáneamente hipertensas

Los experimentos con animales realizados en esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid (URJC), y se diseñaron acorde a la normativa contenida por la Regulación de la Comisión Europea para el cuidado y el empleo de animales de experimentación 2010/63/UE que actualiza la Directiva (86/609/CEE), y el Real Decreto 118/2021 en modificación del 53/2013 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Del mismo modo, todos los procedimientos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el Comité Ético de la URJC y por la Comunidad de Madrid (PROEX 174.7/21). Siguiendo el principio de las tres erres, en la investigación desarrollada se priorizó la reducción del número de animales usando únicamente la cantidad mínima necesaria y el refinamiento de las técnicas utilizadas para asegurar el bienestar animal.

Para este estudio se utilizaron 32 ratas macho SHR y 24 ratas macho WKY (Charles River Laboratories, España). Los animales llegaron al estabulario de la URJC con 10-11 semanas de vida y un peso comprendido entre 230 g y 280 g. Transcurrido el periodo de aclimatación de una semana, se procedió al registro del peso corporal para distribuirlos en grupos de 4 animales de forma homogénea acorde a su peso, en jaulas transparentes (40 cm x 28 cm x 25 cm) (Figura 12). El lecho de virutas de serrín presente en las jaulas se reemplazó semanalmente y se aseguraron unas condiciones constantes de temperatura (22-23°C), humedad (60%) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (periodo de luz comprendido entre las 8 y las 20 h). Al comienzo del estudio se distribuyeron las 32 ratas SHR en 4 grupos de 8 animales cada uno, y las 24 ratas WKY se dividieron en 3 grupos de 8 animales cada uno. Durante todo el periodo de estudio, los animales ingirieron *ad libitum* una dieta estándar sólida (A04, SAFE, Francia), y agua corriente filtrada renovada periódicamente.



**Figura 12.** Distribución de las ratas SHR y WKY en grupos en la sala cedida por el animalario de la Universidad Rey Juan Carlos.

A cada uno de los grupos de animales se les administraron diferentes productos (hidrolizado de quinua o vitamina C) en el agua de bebida. Las dosis administradas de hidrolizado de quinua a los grupos de ratas SHR se establecieron en 250 mg/kg/día y 1000 mg/kg/día. En el caso de las ratas WKY únicamente se administró la dosis de 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua. La dosis de vitamina C, compuesto antioxidante utilizado como control positivo, se estableció para ambas cepas en 250 mg/kg/día. Finalmente, a los controles negativos de WKY y SHR únicamente se les administró agua corriente filtrada (Figura 13).

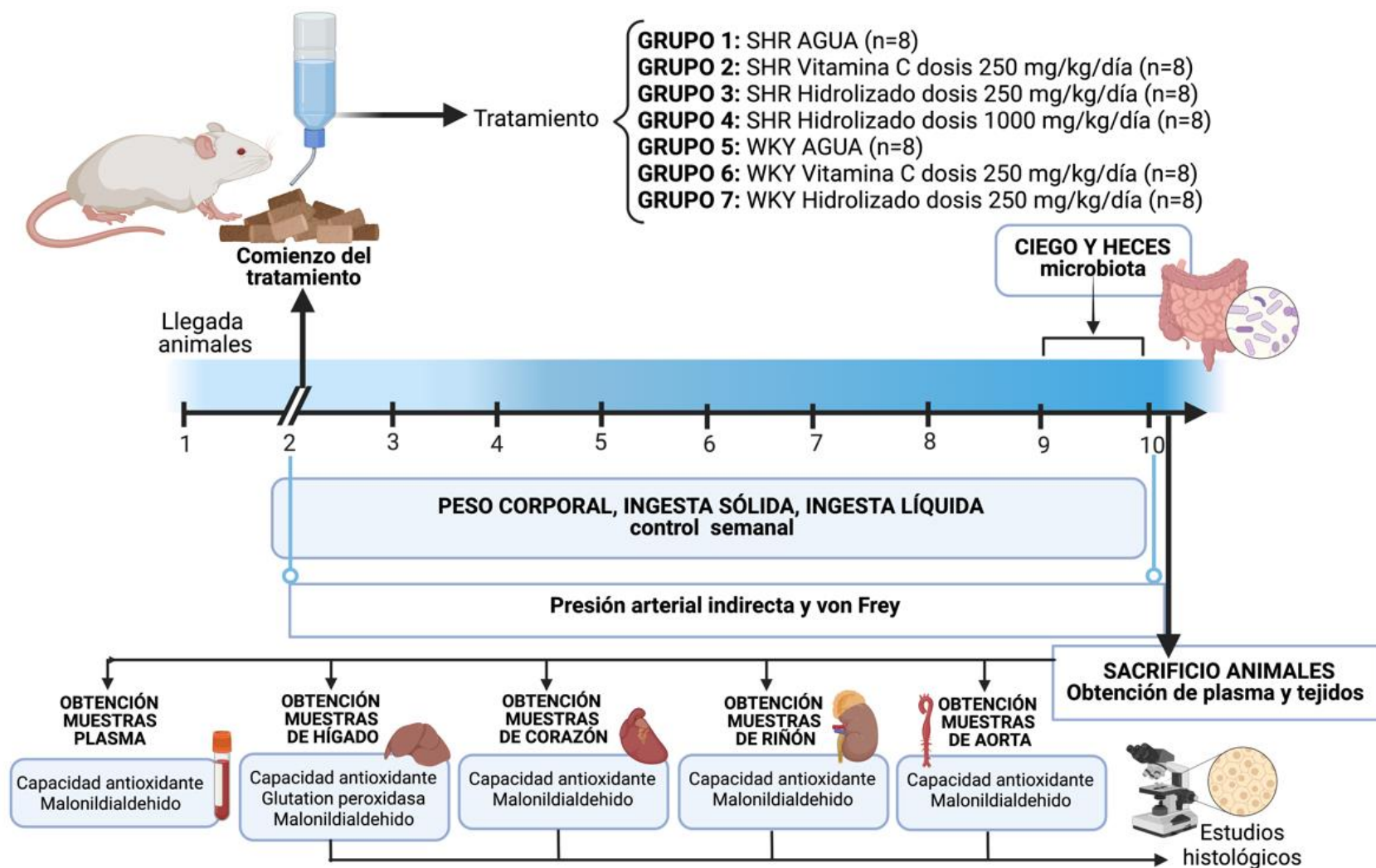


Figura 13. Línea temporal del estudio con grupos experimentales, protocolos y determinaciones empleadas.

El seguimiento del estudio en animales, así como las técnicas y determinaciones realizadas se explican a continuación en los apartados 3.5.2- 3.5.9.

### **3.5.2. Seguimiento y evaluación del peso corporal e ingestas**

El control del peso corporal y de la ingesta sólida se realizó de forma semanal durante todo el periodo de estudio, mientras que el registro y ajuste de la ingesta líquida se efectuó cada 2-3 días de la forma que se especifica a continuación:

- Control del peso corporal:

La evaluación del peso corporal se realizó semanalmente. Para ello, cada rata se pesó de forma individual en una báscula calibrada y se calculó la media del peso corporal por jaula para así ajustar la dosis de tratamiento.

- Control de la ingesta sólida:

El seguimiento de la ingesta sólida se efectuó cada semana, registrando el consumo realizado por jaula. Para estimar la ingesta sólida individual se dividió el peso de la ingesta total obtenida por jaula, por el número de animales que había en la jaula.

- Control y ajuste de la ingesta líquida:

El registro de la ingesta líquida se realizó tres veces por semana. Para ello, se midió el líquido restante de los biberones de cada jaula, cuya diferencia con el contenido inicial nos permitió establecer la ingesta líquida estimada por jaula que, dividida por el número de animales de cada jaula, nos dio la ingesta líquida estimada por rata. Teniendo en cuenta este dato y el peso medio de los animales obtenido cada semana se reajustaron la dosis para cada jaula semanalmente. Esto permitió que los animales recibiesen una concentración diaria constante según el grupo de tratamiento, y minimizar el potencial deterioro que pudiera ocurrir en el hidrolizado, y se aseguró además un aporte regular de bebida durante toda la semana.

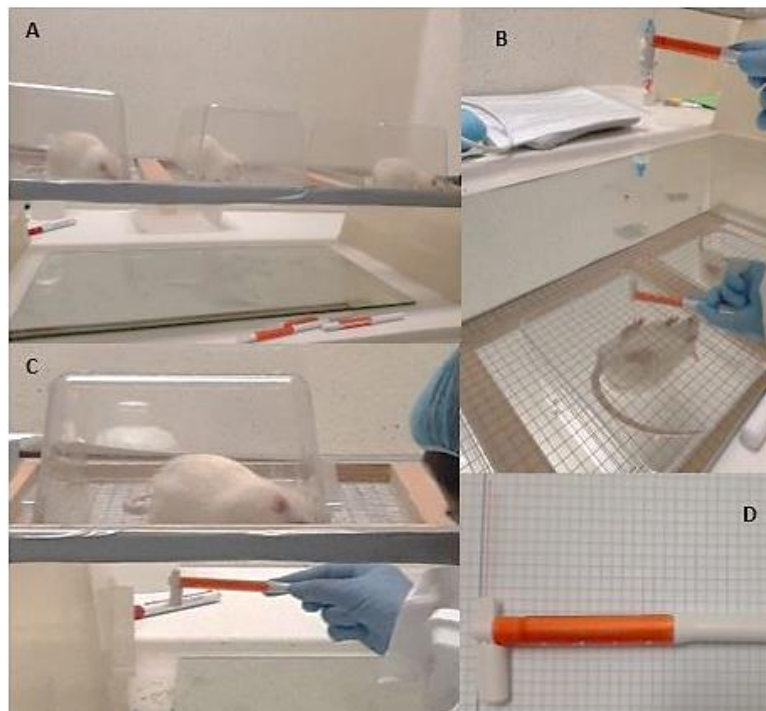
### **3.5.3. Estudio de neuropatía periférica. Método de los filamentos de *Von Frey***

La evaluación de los umbrales a la sensibilidad mecánica y aparición de alodinia táctil se realizó en las semanas 2, 6 y 8 del estudio. A través de diferentes filamentos de nylon calibrados, se cuantificó la presión ejercida en la superficie plantar de la pata trasera del



animal que ocasionaba la retirada de dicha extremidad. Los filamentos presentaban distinto grosor, longitud e intensidad (4, 6, 8, 10, 15 y 26 g) que fue *in crescendo* conforme la presión ejercida no era suficiente para levantar la pata trasera del animal.

Con la finalidad de disminuir el estrés del animal y obtener resultados válidos, los animales se acostumbraron al test durante al menos 10 minutos el día previo y el mismo día de la prueba. El test consistió en la aplicación de cada filamento comenzando por el de menor presión, de manera perpendicular a la superficie plantar de la pata trasera del animal durante 1 segundo con un descanso superior a 3 segundos (Figura 14). Se consideró una respuesta positiva cuando el animal retiraba la pata al menos 3 de las 5 veces que se realizó el procedimiento en cada pata trasera (García et al., 2021; Martínez et al., 2018).

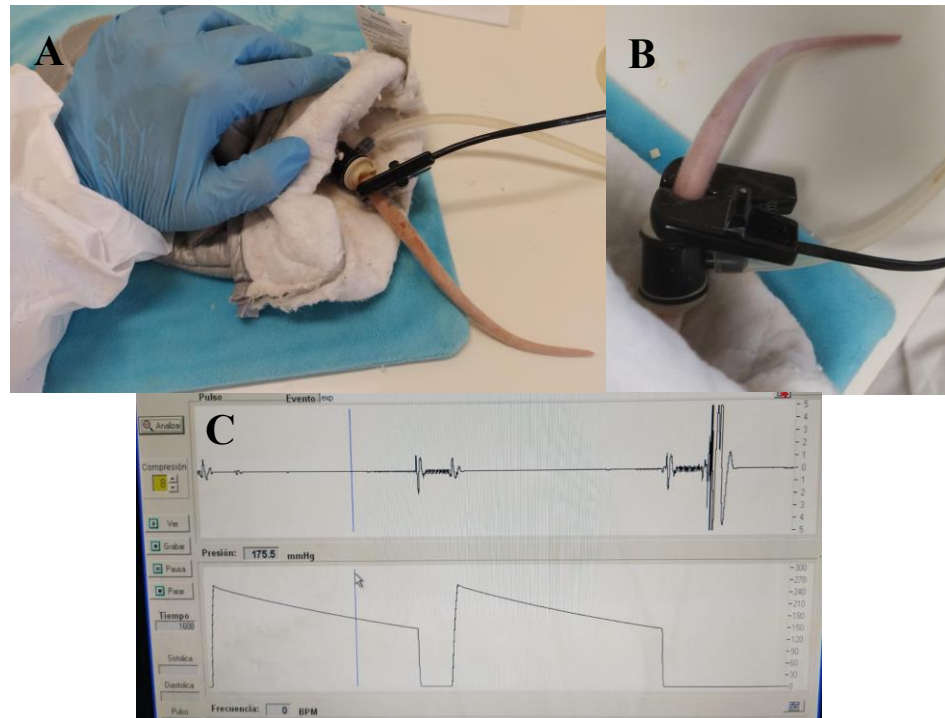


**Figura 14.** Representación del procedimiento para llevar a cabo el test de los filamentos de von Frey (A). Realización del test en las patas traseras de la rata desde diferentes perspectivas (B y C). Ejemplo de filamento de nylon usado para llevar a cabo el test (D).

Finalmente se calculó la media del valor de presión ejercida con el filamento que ocasionó la respuesta positiva y se valoró la tendencia desarrollada a lo largo de los diferentes periodos de medición. Los resultados obtenidos se expresaron como la medida de presión en gramos (g).

### **3.5.4. Medida de la presión arterial**

La medida de la PAS se realizó de manera indirecta mediante una modificación de la técnica del manguito en la cola (Buñag, 1973). Este procedimiento se basa en la utilización de un esfigmomanómetro, de forma muy similar a la técnica empleada para la medición de la presión arterial en humanos. Antes de comenzar la medición de la presión arterial se precisó de un periodo de adaptación al proceso y al entorno para minimizar el estrés del animal y obtener resultados fiables. Para que se produzca una medida válida, también se requiere que la rata tenga una temperatura corporal entre 37-38°C para así asegurar la dilatación de la arteria caudal localizada en la cola de la rata. Cuando las condiciones ambientales fueron las adecuadas y el animal se encontró tranquilo, se procedió a la colocación del manguito y el transductor para obtener al menos 5 medidas homogéneas de la PAS. Habitualmente el animal se coloca en un cepo, que suele estar adaptado a un sistema calefactado, para evitar movimientos bruscos del animal durante el ensayo y, como la presencia de oscuridad favorece la relajación del animal, este sistema suele también proporcionar oscuridad para la realización de la medida. En nuestro caso, para minimizar el estrés del animal se utilizó un guante de cocina que proporciona oscuridad y mayor confort a los animales, y para mantener la temperatura adecuada se empleó una manta eléctrica. Los resultados se expresaron en mm Hg (Figura 15).



**Figura 15.** Procedimiento empleado para la medición de la presión arterial empleando un guante que aporta oscuridad y confort a los animales (A), colocación del manguito y transductor utilizado durante la prueba (B) y muestra de presión arterial en una rata de estudio (C).

### 3.5.5. Finalización del estudio y toma de muestras para análisis

Transcurrido el periodo de intervención, se procedió al sacrificio de los animales y a la obtención de las muestras de sangre, órganos y heces para su posterior análisis. Para ello, los animales se mantuvieron en ayunas durante 16 horas, pero sin restringir el acceso a agua. Al día siguiente, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (120 mg/kg) y se sacrificaron por decapitación con guillotina para la recolección de la sangre, que se realizó en tubos con heparina de litio, para obtener las muestras de plasma tras el posterior centrifugado de las mismas. A continuación, se extrajeron los órganos de interés: corazón, hígado, riñón, aorta, cerebro, bazo, pulmón, músculo, tejido adiposo epididimal y tibia. Una muestra de cada órgano se almacenó en formaldehído (4%) para el análisis histológico, y otras dos muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su utilización posterior en pruebas bioquímicas y de expresión génica. Las muestras de ciego y heces se recogieron de la sección final del intestino grueso del animal y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  de forma similar al resto de tejidos.



### **3.5.6. Homogeneización de tejidos**

Para la determinación del glutatión reducido, las muestras de hígado, corazón, aorta y riñón se homogeneizaron a 4°C con tampón fosfato pH 7,4 utilizando para ello un equipo de dispersión (ULTRA-TURRAX®, China). A continuación, los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 5000 g y 4°C durante 15 minutos. Tras recoger las alícuotas de los sobrenadantes, se procedió a su almacenamiento a -80°C hasta su utilización.

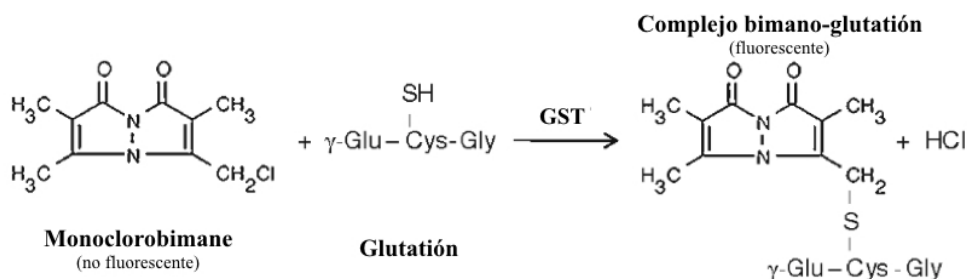
### **3.5.7. Evaluación de la capacidad antioxidante del plasma y tejidos**

La determinación de la capacidad antioxidante del plasma y los tejidos homogeneizados se efectuó siguiendo el ensayo ORAC descrito previamente en el apartado 3.3.1. En el caso de los tejidos analizados el hígado, el corazón, la aorta y el riñón se homogeneizaron siguiendo el procedimiento que se detalla en el apartado 3.5.6. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de equivalente de trolox/ $\mu\text{l}$  de muestra en el caso del plasma, y en  $\mu\text{mol}$  de equivalente de trolox/g de proteína para las muestras de hígado, corazón, aorta y riñón. El contenido de proteína presente en las muestras de los tejidos analizados se determinó siguiendo el método Lowry, descrito en el apartado 3.3.1.

### **3.5.8. Determinación del glutatión reducido en hígado**

La concentración de glutatión reducido presente en el hígado se realizó de acuerdo al método colorimétrico monoclorobimane (Kamencic et al., 2000). Para ello, en una placa multipocillo de poliestireno negra (Nunc, Dinamarca) se añadieron 90  $\mu\text{l}$  de sobrenadante del homogeneizado de hígado junto a 10  $\mu\text{l}$  de una solución en una relación 1:1 de glutatión S-transferasa (1U/ml) procedente de caballo (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y monoclorobimane 1 mM (Fluka Biochemical, Suiza). La placa se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. El glutatión y el monoclorobimane ocasionan la formación de un complejo fluorescente, en una reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (Figura 16). Transcurrido el periodo de incubación, la determinación del

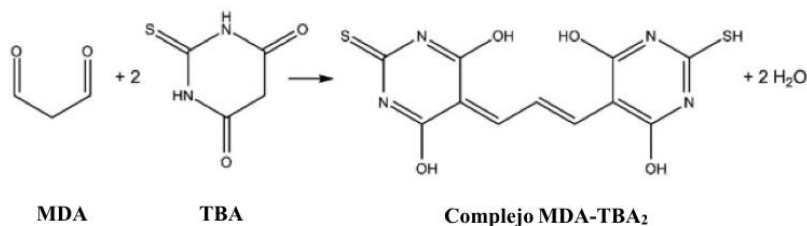
glutatión presente en la muestra se cuantificó mediante un fluorímetro (FLUOstar, OPTIMA), a una longitud de onda de excitación de 390 nm y de emisión de 510 nm. Para estandarizar la concentración de glutatión en hígado se midió el contenido de proteína de la muestra siguiendo la técnica espectrofotométrica descrita en el apartado 3.3.1. Finalmente, los resultados finales se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de glutatión reducido/g de proteína.



**Figura 16.** Esquema representativo de la reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (GST) del monoclorobimane con el glutatión para formar un aducto fluorescente de bimano-glutatión (Machado & Soares, 2012).

### 3.5.9. Determinación de malonildialdehído en plasma y tejidos

Para determinar la concentración de MDA en las muestras de plasma y en las muestras de tejidos previamente homogeneizados, se realizó el ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Moreno-Fernández, Garcés-Rimón, et al., 2018; Rodríguez-Martínez & Ruiz-Torres, 1992). Para mejorar la sensibilidad del método y aumentar la liberación de MDA, se llevó a cabo inicialmente una hidrólisis de las proteínas en medio básico y para ello se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 N a 100  $\mu\text{L}$  de la muestra de estudio y la mezcla se incubó a 60°C durante 30 minutos. A continuación, se incorporaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 20% en HCl 0,6 M (1:1 v/v), y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos para inducir la precipitación proteica. Tras centrifugar las muestras a 15000 g durante 15 minutos, se añadió al sobrenadante el TBA (120 mM en Tris 260 mM y pH 7) en una proporción 1:5 (v/v) y la mezcla resultante se calentó a 97°C durante 30 minutos. La reacción entre el MDA y el TBA desencadena la formación de un pigmento estable de color rojo-rosáceo, con un coeficiente de absorción molar en el espectro visible (540 nm) de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Figura 17). La absorbancia del aducto resultante con una proporción MDA:TBA de 1:2 se cuantificó a través de un lector multi-modal de microplacas (Cytation 5 Biotek, Estados Unidos). Los resultados de MDA en la muestra de estudio se expresaron en  $\mu\text{M}$  (nmol/ml).



**Figura 17.** Reacción del malonildialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un aducto con un color rojo-rosáceo de MDA-TBA en una proporción 1:2 (Weitner et al., 2016).

### 3.6. Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones *in vitro* se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). El análisis estadístico de la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles se realizó a través del análisis de la varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés: *Analysis Of Variance*) de una vía, seguido del test post hoc de Bonferroni. Para determinar la relación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los hidrolizados de quinua se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Los resultados obtenidos tras realizar el estudio en *Saccharomyces cerevisiae* se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para el procesamiento de los datos se realizó la comparación de medias de los valores de r, k y UFCs por compuesto y dosis frente al antioxidante de referencia y cultivo control aplicando un ANOVA de una vía, seguido del test post hoc de Bonferroni y un p-valor  $p < 0,05$  para establecer la significación estadística. Además, se generaron gráficos *box-plots* entre las medias de cada compuesto y dosis, con los antioxidantes de referencia. Las comparaciones realizadas se llevaron a cabo con el programa Excel para Windows (Microsoft, Estados Unidos).

Los resultados obtenidos en los animales se expresaron como la media  $\pm$  EEM, para al menos 6 animales. Asimismo, el procesamiento y comparación de los datos se efectuó a través del ANOVA de una o dos vías, seguido del test post hoc de Bonferroni. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 9.0.2 para Mac OS (Graph-Pad Software, Estados Unidos).

#### **4. Resultados y Discusión**

La quinua presenta unas características nutricionales de gran interés para la formulación de nuevos alimentos. Entre algunos de estos nuevos alimentos, los análogos a la leche de origen vegetal han generado un gran interés en los últimos años, y en la actualidad existen en el mercado alternativas a la leche derivadas principalmente de soja, arroz, almendras o avena (Silva et al., 2020). Sin embargo, muchas de estas alternativas vegetales no logran alcanzar un perfil nutricional similar a la leche, y de forma general las bebidas vegetales presentan un menor contenido en proteína, y esta es, además, de peor calidad que la que proporciona la leche (Chalupa-Krebzdak et al., 2018).

Se sabe que la aceptabilidad de un alimento viene determinada por la combinación sinérgica de diferentes atributos como son las características sensoriales, los factores nutricionales, el coste, el formato de presentación o las campañas de marketing realizadas (Isaskar et al., 2021), y también se sabe, que las propiedades sensoriales como el sabor, el olor, el aroma y la textura influyen significativamente las preferencias de los consumidores (Yang & Lee, 2019). Por lo tanto, cualquier diseño de un nuevo alimento que no tenga en cuenta las preferencias gustativas y los hábitos alimentarios de la población a la que se destina está condenado al fracaso, y será esencial modificar y mejorar las propiedades sensoriales de los nuevos ingredientes y alimentos desarrollados para conseguir una adaptación tecnológica y sensorial óptima, si se quiere tener éxito en su comercialización. A este respecto, las bebidas vegetales son referenciadas también por los consumidores como productos de baja calidad sensorial. Esto se debe a la presencia de sabores extraños como ocurre especialmente con el sabor amargo, característico de distintas semillas y relacionado con el contenido de terpenos, flavonoides o glucosinolatos (Ntie-Kang, 2019), y debido también a las texturas deficientes ocasionadas por la inestabilidad de la emulsión y por el alto contenido de almidón en este tipo de matrices vegetales (Vaikma et al., 2021). Por lo tanto, otro de los grandes retos de las bebidas vegetales alternativas a la leche consiste en lograr un producto con unas características tecnofuncionales óptimas, ya que las proteínas vegetales, a diferencia de las proteínas presentes en la leche, son mayoritariamente insolubles o como ya hemos comentado anteriormente presentan una limitada capacidad de emulsión. Esto es debido a que las proteínas nativas de los vegetales se encuentran habitualmente almacenadas en la semilla formando una estructura estable con una baja solubilidad (Mäkinen et al., 2015). Para conseguir resolver los problemas que se plantean en

las bebidas vegetales, la quinua se postula como una alternativa de origen vegetal de gran interés, por su elevada calidad nutricional, y especialmente por su aporte proteico y por contener todos los aminoácidos esenciales en un balance adecuado (Pineli et al., 2015). Nuestra propuesta se basa en el uso de la quinua y en el uso de la hidrólisis enzimática para mejorar las características fisicoquímicas, la sensorialidad y la bioactividad de una nueva bebida vegetal a base de quinua. El proceso de hidrólisis enzimática ya se ha utilizado para desarrollar una bebida de quinua y producir una mejora significativa de la solubilidad (Jeske et al., 2018). Sin embargo, en nuestro caso, además de mejorar sus propiedades tecnológicas, se pretende mejorar sus propiedades sensoriales y bioactivas, y por ello nos planteamos como objetivo general la obtención de hidrolizados de proteínas derivados de quinua con un adecuado perfil sensorial y con actividad antioxidante.

En esta Tesis Doctoral, se han empleado diferentes variedades de quinua: blanca, roja y negra, y para conseguir la hidrólisis de las proteínas se han utilizado diferentes enzimas (proteasas) de grado alimentario. En primer lugar, se presentarán en este apartado los resultados derivados de la evaluación sensorial básica, así como la determinación *in vitro* de la capacidad antioxidante y del contenido en compuestos fenólicos totales de los diferentes hidrolizados de quinua desarrollados. Estos análisis permitirán seleccionar el/los hidrolizados de quinua más prometedores. En el siguiente apartado se expondrán y discutirán los resultados obtenidos tras evaluar la actividad antioxidante *in vivo* del hidrolizado de quinua en un organismo modelo: *Saccharomyces cerevisiae*. Por último, se expondrán los resultados obtenidos tras evaluar el potencial efecto beneficioso sobre la salud cardiovascular del hidrolizado de quinua con actividad antioxidante seleccionado, en un modelo experimental de HTA y de estrés oxidativo como es la rata SHR.

#### **4.1. Obtención y selección de hidrolizados de quinua. Análisis sensorial y actividad biológica *in vitro***

La primera parte de esta Tesis Doctoral consistió en la obtención de hidrolizados de las variedades de quinua blanca, roja y negra. En un paso previo a la hidrólisis enzimática se efectuó un procedimiento de prelavado en cada una de las variedades de quinua para lograr una reducción significativa del contenido de saponinas. Las saponinas son compuestos glucósidos responsables del amargor característico de este pseudocereal y que pueden limitar

la biodisponibilidad de minerales como el hierro, el magnesio o el manganeso (Melini & Melini, 2021). De acuerdo a la bibliografía, el prelavado es capaz de inducir una reducción de hasta el 96% del contenido de saponinas presentes en la quinua (El Hazzam et al., 2020). Para llevar a cabo los hidrolizados se emplearon enzimas de grado alimentario de distintos orígenes (digestivo, fúngico, bacteriano y vegetal), utilizadas comúnmente en la mejora de productos alimenticios. La modificación enzimática se considera una forma efectiva de mejorar las propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos, y especialmente se utilizan para mejorar la estabilidad térmica, la resistencia a la salinidad y la actividad antioxidante (Chang et al., 2017). La hidrólisis afecta también al tamaño molecular y a la hidrofobicidad, así como a los grupos polares e ionizables (Pacheco-Aguilar, et al., 2008), todas ellas propiedades relacionadas con la solubilidad del hidrolizado, que se considera una característica útil para muchas aplicaciones alimentarias y que, además, influye también en otras propiedades funcionales muy relevantes en la industria como la emulsión y las propiedades espumantes (Ai et al., 2019; Yüceer & Caner, 2021). En este trabajo las hidrólisis se realizaron en las condiciones óptimas de actuación de cada enzima, teniendo en cuenta las especificidades de cada una de ellas proporcionadas por cada fabricante. Entre las propiedades fisicoquímicas que afectan a los procesos de hidrólisis el pH, la temperatura, así como la especificidad de la enzima por el sustrato se consideran aspectos determinantes en el resultado de la hidrólisis (Karami & Akbari-Adergani, 2019). En las muestras de quinua blanca, roja y negra preparadas se obtuvo un valor medio de pH de 5,7, 5,8 y 5,5, respectivamente. Estos valores de pH de las diferentes variedades de quinua fueron similares y, dado que la mayoría de enzimas pueden actuar en un intervalo amplio de pH, éste no se modificó para llevar a cabo las diferentes hidrólisis al encontrarse dentro del rango de actividad de todas las enzimas. Sin embargo, sí fue necesario modificar el pH cuando se realizaron los hidrolizados con BC Pepsin y Alcalasa 2.4 LFG, ya que en este caso las hidrólisis se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante a un pH de 2 y 7-9, respectivamente.

Aunque los estudios de análisis sensorial y la determinación *in vitro* de la actividad antioxidante se realizaron de forma paralela, se presentan y discuten en primer lugar los resultados obtenidos tras realizar la evaluación sensorial de los hidrolizados obtenidos de las diferentes variedades de quinua. Previo al proceso de hidrólisis, las distintas variedades de quinua presentaron los tonos más claros respecto al resto de hidrolizados y así como un sabor agradable, si bien es cierto que en el caso de la quinua negra ambas propiedades se

observaron en un grado menor. Los hidrolizados obtenidos con Promod 279P, Flavorpro 373MDP, Flavorpro 750MDP y Alcalasa 2.4 LFG mostraron los resultados más prometedores tras la evaluación sensorial básica. El resto de enzimas empleadas en esta Tesis Doctoral mostraron características sensoriales desagradables relativas a la textura, aspecto, sabor y/u olor desde los primeros tiempos de hidrólisis. De forma general, los hidrolizados mostraron buenas características sensoriales que fueron deteriorándose conforme transcurrió el proceso de hidrólisis (Tabla 8-11). A partir de las 6 horas de hidrólisis enzimática, en la mayoría de hidrolizados se evidenció un pardeamiento y la aparición de matices amargos, que provocaron un deterioro de las características sensoriales básicas. El hidrolizado de quinua roja producido con Alcalasa 2.4 LFG con una duración aproximada de entre 1 y 4 horas fue el más prometedor, teniendo en cuenta los aspectos sensoriales básicos analizados. En el caso de los hidrolizados de quinua negra y blanca obtenidos con Alcalasa 2.4 LFG en dichos periodos de tiempo se identificaron principalmente matices amargos, ácidos y astringentes que afectaron de forma negativa a la sensorialidad.

**Tabla 8.** Evaluación sensorial básica de los hidrolizados producidos con Promod 279P en las diferentes variedades de quinua.

Duración hidrólisis	Hidrolizados enzimáticos con Promod 279P		
	Quinua Blanca	Quinua Roja	Quinua Negra
0	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo y sabor agradable	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo y sabor agradable	Tonalidad menos blanquecina que el resto de quinuas a tiempo 0. Decanta con el tiempo, olor agradable y sabor neutro con matices amargos
1	Tonalidad blanquecina con aumento del dulzor respecto al tiempo anterior	Tonalidad más pardeada con reducción del dulzor	
2	Mantiene mismas características que el tiempo anterior	Mantiene mismas características del tiempo anterior	
4	Empieza a pardear con sabores poco agradables característicos de la fermentación	Tonalidad similar al tiempo anterior, incremento de la acidez	Comienzan a pronunciarse matices amargos
6	Se acentúan las características del tiempo anterior		Color pardeado, sabor y olor desagradable
24	Color pardeado, sabor y olor desagradable		

**Tabla 9.** Evaluación sensorial básica de los hidrolizados producidos con Flavorpro 373MDP en las diferentes variedades de quinua.

Duración hidrólisis	Hidrolizados enzimáticos con Flavorpro 373MDP		
	Quinua Blanca	Quinua Roja	Quinua Negra
0	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo y sabor agradable	Tonalidad menos blanquecina que el resto de quinuas a tiempo 0. Decanta con el tiempo, olor agradable y sabor neutro con matices amargos	Tonalidad menos blanquecina que el resto de quinuas a tiempo 0. Decanta con el tiempo, olor agradable y sabor neutro con matices amargos
1			Incremento del dulzor y pardeamiento respecto al tiempo anterior
2	Acentuación del sabor dulce respecto al tiempo anterior	Color pardeado con sabor y olor amargo	Pierde el dulzor y muestra un aumento del amargor
4	Comienza a mostrar matices amargos y reducción del dulzor		
6	Color pardeado, sabor y olor amargo		
24	Color pardeado, sabor y olor amargo	Color pardeado con sabor y olor amargo	Color pardeado con sabor y olor amargo

**Tabla 10.** Evaluación sensorial básica de los hidrolizados producidos con Flavorpro 750MDP en las diferentes variedades de quinua

Duración hidrólisis	Hidrolizados enzimáticos con Flavorpro 750MDP		
	Quinua Blanca	Quinua Roja	Quinua Negra
0	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo y sabor agradable	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo y sabor agradable	Tonalidad menos blanquecina que el resto de quinuas a tiempo 0. Decanta con el tiempo, olor agradable y sabor neutro con matices amargos
1	Olor y sabor dulce superior al tiempo anterior	Aumento del dulzor y viscosidad respecto tiempo anterior	Sabor ligeramente amargo con tonos astringentes
2		El dulzor se mantiene pero se acentúan los tonos amargos	
4			Color pardeado, sabor y olor ácido
6	Comienza a tener matices amargos de fermentación	Color pardeado, sabor y olor amargo	Color pardeado, sabor y olor ácido
24	Color pardeado, sabor y olor amargo		



**Tabla 11.** Evaluación sensorial básica de los hidrolizados producidos con Alcalasa 2.4LFG en las diferentes variedades de quinua

Duración hidrólisis	Hidrolizados enzimáticos con Alcalasa 2.4LFG		
	Quinua Blanca	Quinua Roja	Quinua Negra
0	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo y sabor agradable	Tonalidad más blanquecina que decanta con el tiempo, olor neutro y sabor agradable	Tonalidad menos blanquecina que el resto de quinuas a tiempo 0. Decanta con el tiempo, olor agradable y sabor neutro con matices amargos
1	Color blanco con pardeado y sabor agradable con ligera astringencia	Color blanco, olor neutro, decanta con el tiempo y sabor agradable	Color blanco, olor agradable y sabor con una marcada astringencia
2	Color blanco con pardeado y sabor ácido con mayor astringencia		Color blanco, olor agradable y sabor con una menor astringencia que el hidrolizado previo
4			Color blanco, olor agradable y sabor con regusto amargo
6			
24	Color pardeado, olor y sabor ácido		

La desaparición de sabores amargos se considera uno de los grandes retos en la aplicación industrial de los hidrolizados de proteínas alimentarias, y un factor decisivo en la aceptabilidad de ese nuevo alimento o ingrediente. En general, el sabor amargo se encuentra fuertemente correlacionado con la presencia de moléculas peptídicas hidrofóbicas (Karami & Akbari-Adergani, 2019). Además, la intensidad de este sabor amargo vinculado a las fracciones peptídicas, parece estar supeditado al grado de hidrólisis de la proteína nativa y al peso molecular de los péptidos resultantes. Durante el proceso de hidrólisis enzimática, se desencadena la liberación de aminoácidos hidrofóbicos relacionados con el sabor amargo, siendo un fenómeno dependiente de la enzima y de la duración de la hidrólisis (Görgüç et al., 2020). Esto podría explicar por qué las hidrólisis de una duración prolongada presentan propiedades organolépticas desfavorables y ello justifica que a partir de las 6 horas la mayoría de los hidrolizados de quinua obtenidos tuvieran sabores amargos y/o desagradables. El pardeamiento observado durante el transcurso de la hidrólisis podría ser resultado de la reacción de maillard, debido a la unión no enzimática entre los grupos carbonilos de los azúcares reductores y los aminoácidos libres que desencadena la formación de melanoidinas proporcionando esa tonalidad pardeada característica (Starowicz & Zieliński, 2019). Diferentes factores como la temperatura, el pH, la duración del tratamiento térmico o la concentración de sustratos determinan el desarrollo de esta reacción. Se ha constatado como el proceso de hidrólisis enzimática en matrices vegetales favorece el

pardeamiento, y éste aumenta conforme lo hace la temperatura y la duración de hidrólisis (Kim et al., 2004)

En cada uno de los hidrolizados obtenidos también se evaluó la actividad antioxidante *in vitro*, aunque solo se muestran y se discuten en esta Tesis Doctoral aquellos resultados de los hidrolizados que mostraron un mejor perfil sensorial. En relación a la actividad antioxidante, dada la complejidad que supone evaluar las reacciones de oxidación-reducción que ocurren en los sistemas biológicos, se han propuesto diferentes métodos analíticos para la evaluación del potencial antioxidante de diferentes compuestos (Munteanu & Apetrei, 2021). De los diferentes métodos, el método ORAC, basado en la capacidad de neutralizar un radical libre fisiológico como es el radical peroxilo, se ha empleado ampliamente en estudios *in vitro* para determinar la actividad antioxidante de matrices alimentarias (Romulo, 2020).

Las tablas 12-14 incluyen los resultados de actividad antioxidante obtenidos en los hidrolizados de quinua blanca, roja y negra que mostraron mejor perfil sensorial. Previo al proceso de hidrólisis enzimática, se evaluó la actividad antioxidante en las diferentes muestras de variedades de quinua. Todas las muestras de quinua sin hidrolizar mostraron una modesta actividad antioxidante en las tres variedades estudiadas, aunque esta actividad fue significativamente superior en la quinua roja (153,9  $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) respecto a la quinua negra (125,1  $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) ( $p < 0,01$ ) y ligeramente más alta, pero sin mostrar diferencias significativas respecto a la quinua blanca (145,6  $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) ( $p > 0,05$ ). Estos datos se corresponden con estudios previos, donde la quinua roja demostró la mayor actividad antioxidante de entre las diferentes variedades de quinua (Han et al., 2019; Liu et al., 2020). Escribano et al. (2017), evaluaron el potencial antioxidante de diferentes variedades y orígenes de quinua, y a pesar de observar una variabilidad considerable según el origen, la variedad de quinua roja mostró también la actividad antioxidante más elevada. Se ha descrito que la presencia de compuestos antioxidantes como los flavonoides, los ecdistoroides o las betacianinas en las variedades de quinua coloreadas, pueden ser responsables de la mayor capacidad de absorción de radicales libres descrita para la variedad de quinua roja (Mariod & Salama, 2020; Choque-Quispe et al., 2021; Souza et al., 2021).

De forma general, el proceso de hidrólisis enzimática ocasionó un incremento de la actividad antioxidante en las diferentes variedades de quinua hasta llegar a un valor máximo, a partir del cual, comenzó a disminuir o sufrió oscilaciones, lo que manifiesta la constante formación y degradación de los diferentes compuestos antioxidantes conforme transcurrió el proceso de hidrólisis. La Tabla 12 muestra la actividad antioxidante de los hidrolizados de quinua blanca. Los hidrolizados que mostraron la mayor actividad antioxidante en esta variedad fueron aquellos obtenidos con Flavorpro 750MDP durante 4 y 6 horas con valores de  $1179,5 \pm 7,8$   $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína y  $1009,4 \pm 4,5$   $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína, respectivamente.

**Tabla 12.** Actividad antioxidante de hidrolizados de quinua blanca medida como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés: *Oxygen radical absorbance capacity*).

Tiempo (h)	Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/g de proteína)			
	Promod 279P	Flavorpro 373MDP	Flavorpro 750MDP	Alcalasa 2.4 LFG
0	$145,6 \pm 9,0$	$145,6 \pm 9,0$	$145,6 \pm 9,0$	$145,6 \pm 9,0$
1	$413,3 \pm 14,7^*$	$432,1 \pm 6,4^*$	$229,5 \pm 19,8^*$	$842,6 \pm 7,3^*$
2	$399,5 \pm 35,5^*$	$473,0 \pm 3,8^*$	$584,8 \pm 13,9^*$	$884,5 \pm 1,8^*$
4	$494,1 \pm 19,0^*$	$693,7 \pm 10,0^*$	$1179,5 \pm 7,8^*$	$608,3 \pm 2,0^*$
6	$801,2 \pm 34,0^*$	$592,8 \pm 14,4^*$	$1009,4 \pm 4,5^*$	$696,4 \pm 3,4^*$
24	$291,4 \pm 9,6^*$	$542,4 \pm 7,0^*$	$774,1 \pm 14,2^*$	$732,2 \pm 1,9^*$

Resultados expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. Se empleó el test de la t de Student para analizar los resultados.  $*p < 0,05$  vs hidrolizado de quinua blanca sin hidrolizar.

En la quinua roja, las actividades antioxidantes más elevadas correspondieron a los hidrolizados obtenidos con Flavorpro 750 MDP a las 4 ( $1815,5$   $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) y a las 24 horas ( $1429,3$   $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína), seguido por el hidrolizado con Alcalasa 2.4 LFG durante 4 horas ( $1300,7$   $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Actividad antioxidante de hidrolizados de quinua roja medida como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés: *Oxygen radical absorbance capacity*).

Tiempo (h)	Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/g de proteína)			
	Promod 279P	Flavorpro 373MDP	Flavorpro 750MDP	Alcalasa 2.4 LFG
0	153,9 $\pm$ 7,5	153,9 $\pm$ 7,5	153,9 $\pm$ 7,5	153,9 $\pm$ 7,5
1	534,1 $\pm$ 5,3*	1251,9 $\pm$ 19,5*	811,8 $\pm$ 6,9*	879,4 $\pm$ 24,0*
2	597,1 $\pm$ 17,1*	892,6 $\pm$ 6,3*	689,6 $\pm$ 12,9*	1118,4 $\pm$ 17,9*
4	790,9 $\pm$ 23,0*	461,8 $\pm$ 9,7*	1815,5 $\pm$ 23,0*	1300,7 $\pm$ 31,7*
6	944,9 $\pm$ 14,7*	679,2 $\pm$ 9,3*	1068,8 $\pm$ 18,1*	1133,8 $\pm$ 34,6*
24	1200,2 $\pm$ 41,5*	1293,6 $\pm$ 9,4*	1429,3 $\pm$ 17,4*	1164,5 $\pm$ 19,8*

Resultados expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. Se empleó el test de la t de Student para analizar los resultados. \* $p < 0,05$  vs hidrolizado de quinua rojas sin hidrolizar.

Los hidrolizados de quinua negra se muestran en la tabla 14. La mayor actividad antioxidante en los hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de quinua negra ocurrió con Flavorpro 373 MDP durante 6 horas ( $2204,3 \pm 6,1 \mu\text{mol ET/g}$  de proteína), seguido por Alcalasa 2.4 LFG durante 6 horas ( $1868,8 \pm 5,9 \mu\text{mol ET/g}$  de proteína) y durante 1 hora ( $1698,7 \pm 6,7 \mu\text{mol ET/g}$  de proteína).

**Tabla 14.** Actividad antioxidante de hidrolizados de quinua negra medida como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés: *Oxygen radical absorbance capacity*).

Tiempo (h)	Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/g de proteína)			
	Promod 279P	Flavorpro 373MDP	Flavorpro 750MDP	Alcalasa 2.4 LFG
0	125,1 $\pm$ 6,2	125,1 $\pm$ 6,2	125,1 $\pm$ 6,2	125,1 $\pm$ 6,2
1	320,2 $\pm$ 31,6*	971,8 $\pm$ 33,2*	203,6 $\pm$ 10,7*	1698,7 $\pm$ 6,7*
2	382,2 $\pm$ 26,5*	1225,3 $\pm$ 8,9*	467,9 $\pm$ 17,6*	1205,3 $\pm$ 5,2*
4	884,5 $\pm$ 45,1*	1445,9 $\pm$ 5,4*	799,8 $\pm$ 15,3*	1536,7 $\pm$ 6,2*
6	729,7 $\pm$ 7,4*	2204,3 $\pm$ 6,1*	657,7 $\pm$ 13,9*	1868,8 $\pm$ 5,9*
24	1191,7 $\pm$ 44,1*	948,9 $\pm$ 19,5*	586,7 $\pm$ 17,4*	1539,0 $\pm$ 5,5*

Resultados expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. Se empleó el test de la t de Student para analizar los resultados. \* $p < 0,05$  vs hidrolizado de quinua rojas sin hidrolizar.

En esta Tesis Doctoral los mejores resultados de actividad antioxidante en las diferentes variedades de quinua y a tiempos más cortos de hidrólisis (tiempos inferiores a las 6 horas, momento en el que el perfil sensorial se ve afectado de manera negativa), se obtuvieron con las enzimas Alcalasa 2.4 LFG y Flavorpro 373MDP. Los valores de ORAC se encontraron en un rango de 60,5 y 308,6  $\mu\text{mol}$  de ET/g de quinua y, de forma general, fueron los hidrolizados de quinua blanca los que presentaron una actividad antioxidante más baja tras la hidrólisis enzimática, cuando se compararon con los hidrolizados de quinua roja y negra. Estos resultados ponen de manifiesto que la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos fue superior incluso a la de otros alimentos considerados como ejemplo por su actividad antioxidante (tabla 15) o a la de otros hidrolizados obtenidos en diferentes matrices alimentarias. A modo de ejemplo, un hidrolizado de alubia negra obtenido con pepsina y pancreatina presentó 1769  $\mu\text{mol}$  ET/g de proteína, siendo estos resultados obtenidos con el mismo método analítico empleado en nuestro estudio (López-Barrios et al., 2016).

**Tabla 15.** Capacidad antioxidante total (ORAC) de diferentes alimentos

Alimentos	ORAC ( $\mu\text{mol}$ ET/g)
Café verde	1081
Açaí	1027
Cacao en polvo	643
Frambuesa negra	192
Nuez pecana	179
Lentejas	72
Almendras	44
Arroz	24
Avena	17

(Crozier et al., 2011; Laurent Souza et al., 2020; USDA, 2010)

Karami y Akbari-Adergani (2019), describieron que el tipo de peptidasa y las condiciones de hidrólisis enzimática determinan el grado de hidrólisis y los péptidos resultantes, y, por tanto, también su potencial actividad antioxidante. En esta Tesis Doctoral, la alcalasa fue una de las proteasas que presentó mejores resultados, lo que está en

consonancia con los resultados obtenidos en otros estudios con hidrolizados de proteína de quinua y otros vegetales. Chirinos et al. (2020), encontraron que los hidrolizados de proteína de quinua en un rango de 120-240 minutos con Alcalasa 2.4L mostraron una mayor actividad antioxidante respecto a los obtenidos con Neutrasa 5.0BG o Flavourzyme 500L, en este caso la actividad antioxidante se realizó con el ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>. En otro estudio realizado por Mahdavi-Yekta et al. (2019) evaluaron las condiciones de hidrólisis óptimas para obtener un hidrolizado de proteína de quinua con alcalasa y pepsina con una mayor actividad antioxidante, y encontraron que una duración de hidrólisis de 150 minutos fue la que ocasionó una actividad antioxidante superior. Asimismo, se comprobó que la actividad antioxidante estaba asociada con el grado de hidrólisis, lo que sugiere la liberación de secuencias peptídicas de bajo peso molecular con un mayor potencial antioxidante conforme transcurría el proceso hidrólisis. La especificidad de las proteasas alcalinas como la alcalasa permite la liberación de péptidos de menor tamaño molecular durante el proceso de hidrólisis enzimática. Las enzimas endopeptidasas entre las que se encuentra la alcalasa provocan la ruptura de los enlaces en los extremos terminales, lo que induce la liberación de las fracciones peptídicas de bajo peso molecular con un mayor potencial antioxidante (Zhang et al., 2012; Gong et al., 2020). De forma general, los hidrolizados de proteína de quinua con un peso molecular inferior a 5 kDa han demostrado una mayor actividad antioxidante respecto a aquellos con un mayor peso molecular (Guo, Hao, Yang, et al., 2021).

De igual modo, numerosos trabajos han demostrado la utilidad del uso de la enzima alcalasa para producir péptidos antioxidantes procedentes de proteínas vegetales. En este sentido, el hidrolizado de proteína de cacahuete con alcalasa exhibió una mayor capacidad antioxidante respecto al obtenido con pepsina (Nyo & Nguyen, 2019). Logarušić et al. (2020) evaluaron la actividad antioxidante de hidrolizados de semillas de lino obtenidos con diferentes proteasas empleando el método ORAC y comprobaron cómo los hidrolizados con alcalasa mostraron los valores más altos con 1928  $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína, mayores a los obtenidos con neutrasa y protamex. Chirinos et al. (2021) observó también que un hidrolizado de proteína de *Lupinus mutabilis* utilizando Alcalasa 2.4 L presentó una mayor actividad antioxidante que con Neutrasa 5.0 BG y Flavourzyme 500 L. De forma similar, el hidrolizado de proteína de patata dulce obtenido con alcalasa mostró una actividad antioxidante superior a la reportada con el resto de enzimas empleadas. En este trabajo la fracción peptídica menor de 3 kDa fue la responsable de la mayor actividad antioxidante

observada en los hidrolizados de proteína obtenidos con alcalasa ( Zhang et al., 2012). Un hidrolizado de proteína de garbanzo obtenido con alcalasa produjo péptidos de un menor tamaño molecular comparado a los reportados con la enzima papaína, y ello supuso una mayor actividad antioxidante (Ahmad Nadzri et al., 2021). En el estudio realizado en esta Tesis Doctoral no realizamos el fraccionamiento peptídico del hidrolizado de quinua seleccionado porque la finalidad del mismo reside en la obtención en última instancia de una bebida empleando toda la matriz, aunque sería de interés en futuras investigaciones corroborar que el incremento de la actividad antioxidante procede en gran medida de los péptidos de menor tamaño molecular liberados durante el proceso de hidrólisis.

Además de la alcalasa, endopeptidasas de origen bacteriano como Flavorpro 373MDP han mostrado una actividad antioxidante elevada en diferentes fuentes proteicas respecto a otras enzimas con diferentes orígenes (Sánchez & Vázquez, 2017; Pan et al., 2020; Piotrowicz et al., 2020). Del mismo modo, aminopeptidasas de origen fúngico entre las que se encuentra Flavorpro 750MDP también han evidenciado un gran potencial para la obtención de péptidos bioactivos con actividad antioxidante (Garcés-Rimón et al., 2015; Borrajo et al., 2020). Estas enzimas también generaron en nuestro estudio hidrolizados con buena actividad antioxidante. Sin embargo, como se ha venido explicando a lo largo de toda esta Tesis Doctoral la sensorialidad se ha considerado también un factor clave y, de entre todos los hidrolizados evaluados, los realizados con Alcalasa 2.4 LFG demostraron un perfil sensorial adecuado unido a una elevada actividad antioxidante.

La siguiente etapa de esta Tesis doctoral consistió en la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos, y este ensayo se realizó únicamente utilizando los hidrolizados de las tres variedades de quinua producidos con Alcalasa 2.4 LFG ya que fueron los que mostraron previamente un mejor perfil sensorial y funcional. Con este análisis queríamos comprobar si el incremento en la actividad antioxidante conforme transcurría el proceso de hidrólisis se debía, al menos en parte, al aumento de compuestos fenólicos liberados de la matriz, como consecuencia de la hidrólisis, o si la actividad antioxidante era producida por la liberación de péptidos bioactivos. El ensayo de Folin-Ciocalteu ha sido ampliamente utilizado para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos en alimentos de origen vegetal. Inicialmente este método fue diseñado para el análisis de proteínas, pero posteriormente sería modificado por Singleton et al. (1999) para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en el vino. La evaluación de los compuestos fenólicos totales es de gran interés

debido a su potencial antioxidante así como por la influencia en las características sensoriales de un alimento (Canivenc-Lavier et al., 2019; Fatima Zohra et al., 2019).

Las variedades de quinua estudiadas mostraron un mayor contenido en compuestos fenólicos totales antes de someterse al proceso de hidrólisis enzimática, y sufrieron un descenso gradual conforme transcurría la hidrólisis (Tabla 16). La quinua blanca mostró una ligera reducción en el contenido de compuestos fenólicos conforme transcurrió el proceso de hidrólisis, cuyas diferencias alcanzaron la significación estadística a partir de las 4 horas de hidrólisis ( $p < 0,05$  vs quinua blanca sin hidrolizar). En el caso de la quinua roja, el contenido de compuestos fenólicos se redujo tras la primera hora de hidrólisis, y se mantuvo estable durante las horas posteriores. De las diferentes variedades, la quinua negra mostró un contenido de compuestos fenólicos superior, y en concreto los valores más altos se encontraron en la quinua negra sin hidrolizar ya que llegó a alcanzar 81 mg GAE/100g de quinua. Los resultados obtenidos en las muestras de quinua sin tratamiento previo son similares a los descritos en la bibliografía. Diaz Valencia et al. (2018), reportaron un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en la quinua negra con 95,9 mg GAE/100 g de quinua respecto al resto de variedades analizadas. Además, en el mismo trabajo el contenido de compuestos fenólicos en la quinua roja y blanca no varió de forma notoria. En este sentido, es importante precisar que existen también diferencias considerables en el contenido de compuesto fenólicos según el origen y las condiciones de cultivo de la quinua. Farajzadeh et al. (2020), reportaron una importante variabilidad en los distintos tipos de quinua analizada, ya que la variedad de *Chenopodium quinua giza* presentó  $38,24 \pm 2,45$  mg GAE / 100 g de quinua comparado a la variedad de *Chenopodium quinoa samaja* con un contenido de  $17,58 \pm 1,12$  mg GAE/100 g de quinua. El contenido de compuestos fenólicos basal observado en nuestro estudio para la quinua negra, es superior a los descritos para el amaranto, otro pseudocereal perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, que contiene 57 mg GAE/100g, y similar al contenido de otras variedades coloreadas de distintas legumbres como la lenteja roja o las alubias negras que alcanzan 72 mg GAE/100g y 90 mg GAE/100g, respectivamente (Rocchetti et al., 2019).



**Tabla 16.** Compuestos fenólicos totales, expresados como mg de Equivalentes de Ácido Gálico (GAE)/100g de quinua tras los diferentes periodos de hidrólisis con la enzima Alcalasa 2.4 LFG

Tiempo (h)	Compuestos fenólicos totales (mg GAE/ 100 g de quinua)		
	Quinua Blanca	Quinua roja	Quinua negra
0	62,8 ± 0,3	68,9 ± 3,2	81,0 ± 2,3
1	52,8 ± 1,4	44,5 ± 2,4*	78,8 ± 5,9
2	54,1 ± 6,1	37,8 ± 2,3*	75,5 ± 4,9
4	48,7 ± 8,3*	42,2 ± 2,3*	72,5 ± 5,0
6	40,1 ± 8,3*	46,1 ± 6,0*	61,0 ± 4,5*
24	41,1 ± 7,8*	51,1 ± 7,2*	54,9 ± 2,2*

Valores expresados como media ± desviación estándar. QB, Quinoa Blanca. QR, Quinoa Roja. QN, Quinoa Negra. Se empleó el test de la t de Student para analizar los resultados. \* $p < 0,05$  vs hidrolizado de quinua sin hidrolizar de la misma variedad.

El proceso de hidrólisis enzimática desencadenó de forma generalizada una reducción en el contenido de compuestos fenólicos. Se sabe que diferentes factores fisicoquímicos como la temperatura pueden ocasionar una reducción de los compuestos fenólicos (Sodeifian & Sajadian, 2021). El procesamiento térmico de los alimentos puede ocasionar cambios en el contenido de compuestos fenólicos, incluyendo su separación de otras estructuras presentes en la matriz y lixiviación, así como la degradación, polimerización o formación de productos de la reacción de Maillards (Massaretto et al., 2011). Además, la estabilidad de los compuestos fenólicos es dependiente de la temperatura, de tal forma temperaturas superiores a los 125°C inducen una degradación significativa de algunos de estos compuestos como el resveratrol, la epicatequina y la miricetina (Liazid et al., 2007). Esto podría explicar la reducción del contenido de compuestos fenólicos observado tras el proceso de hidrólisis, y parece razonable que el incremento de la temperatura para lograr la inactivación de la enzima Alcalasa 2.4 LFG pudiera provocar un deterioro en el contenido de compuestos fenólicos de los hidrolizados. Esta reducción de compuestos fenólicos no fue drástica, porque tampoco se alcanzaron temperaturas de inactivación elevadas. Dini et al. (2010), observaron que la presencia de compuestos fenólicos se redujo de 77,2 mg GAE/100 g quinua hasta 28,7 mg GAE/100 g quinua tras someterse a un proceso térmico por cocción alcanzado la temperatura de ebullición. En dicho trabajo, una fracción de los compuestos

fenólicos presentes en la quinua se liberaron durante el tratamiento térmico ya que 14 mg GAE/100 g de quinua fueron identificados en el agua de cocción. Estas pérdidas pueden llegar a ser incluso superiores, ya que se ha reportado que un tratamiento de cocción redujo la concentración inicial de compuestos fenólicos de quinua perlada de 67,8 mg GAE/100 g a 8,7 mg GAE / 100 g (Mhada et al., 2020).

Hay también que tener en cuenta que el proceso de hidrólisis puede provocar una disrupción de la matriz alimentaria y desencadenar la liberación de compuestos fenólicos que se encontraban unidos a diferentes complejos estructurales (Nickel et al., 2016). En nuestro caso, aunque se hubiera producido esta liberación durante el proceso de hidrólisis cuando la temperatura era más baja, no se observó una liberación de compuestos fenólicos suficiente para contrarrestar la degradación sufrida debido al incremento de la temperatura a la que se sometieron los hidrolizados para inactivar la enzima.

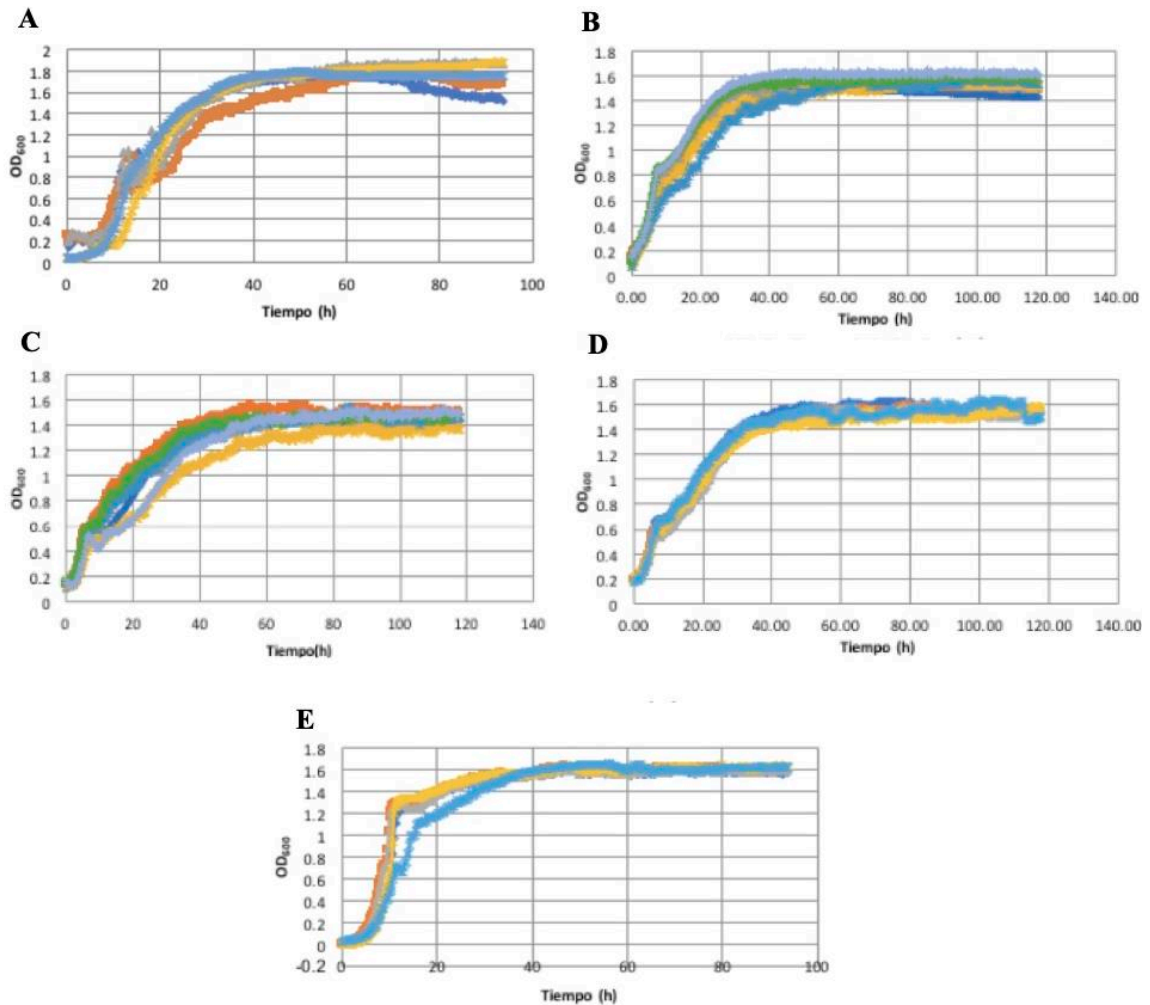
Para determinar la correlación entre el contenido de compuestos fenólicos de los hidrolizados de quinua y su actividad antioxidante, se decidió calcular el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados de este test demostraron que la capacidad de absorción de radicales de oxígeno de los hidrolizados de quinua no estaba correlacionada con el contenido total de compuestos fenólicos ( $p > 0,05$ ). Estos hallazgos sugieren que el incremento en la actividad antioxidante que se produce en los hidrolizados de las diferentes variedades de quinua como resultado del proceso de hidrólisis enzimática, no fue debido al aumento en el contenido de compuestos fenólicos, sino más bien a la liberación de otros compuestos con potencial antioxidante, como es el caso de los péptidos bioactivos.

Tras llevar a cabo la evaluación sensorial y analizar la actividad *in vitro* de los diferentes hidrolizados de quinua desarrollados, se decidió seleccionar finalmente el hidrolizado de quinua roja producido con Alcalasa 2.4 LFG durante 2 horas, por presentar de forma simultánea un elevado potencial antioxidante y unas propiedades sensoriales adecuadas. Por tanto, fue este hidrolizado el que se utilizó posteriormente para investigar su actividad *in vivo*, primero para evaluar su actividad antioxidante utilizando un organismo modelo como es *Saccharomyces cerevisiae*, y posteriormente para evaluar su potencial efecto antioxidante sobre la salud sobre un modelo murino de HTA y estrés oxidativo, la rata SHR.

#### **4.2. Evaluación de la actividad antioxidante *in vivo* del hidrolizado de proteínas de quinua roja en un organismo modelo. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741**

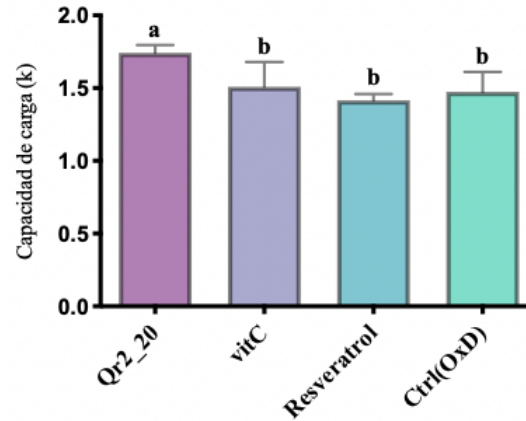
En esta Tesis Doctoral, el hidrolizado de quinua roja tratado con Alcalasa 2.4 LFG durante 2 horas se testó usando *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 para evaluar su actividad antioxidante *in vivo*. El uso de este modelo experimental ofrece una serie de ventajas en la investigación biomédica descritas en el apartado 1.3.1 que lo hacen de gran interés para el estudio de procesos biológicos como el estrés oxidativo y el efecto de compuestos con potencial antioxidante sobre la resistencia al estrés oxidativo (Frassinetti et al., 2012; Meng et al., 2017; Bonache et al., 2018). La capacidad antioxidante *in vivo* del hidrolizado de quinua roja seleccionado se comparó con otros compuestos antioxidantes de referencia como la vitamina C y el resveratrol, compuestos sobre los que existe evidencia contrastada de una mejora de la tolerancia al estrés oxidativo en este modelo experimental (Saffi et al., 2006; Dani et al., 2008). Como agente inductor de estrés oxidativo se utilizó peróxido de hidrógeno.

En la Figura 18 se muestra un ejemplo de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4741 obtenidas para cada compuesto y dosis en los experimentos de Bioscreen c. Se observó que transcurridas 70 horas de experimento todas las muestras analizadas alcanzaron una *fase plateau*, lo que permitió reajustar los parámetros para la construcción de la regresión logarítmica con la librería Growthcurver y poder así comparar todas las lecturas entre sí.



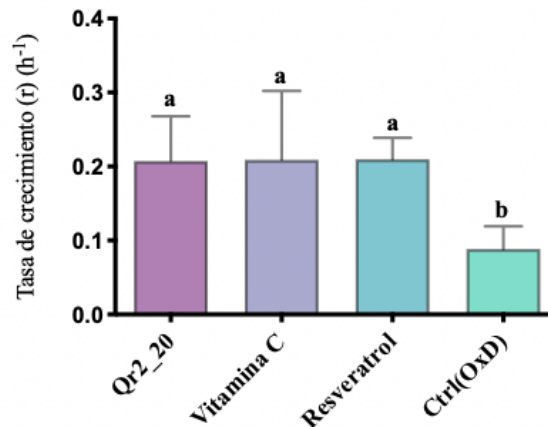
**Figura 18.** OD<sub>600</sub> en función del tiempo (horas) de los microcultivos en Bioscreen c de *S. cerevisiae* en YPOxD con 20µL de la muestra quinua roja 1 (A), con 10µL de la muestra resveratrol (B), con 10µL de la muestra de vitamina C (C), sin tratamiento antioxidante (D) y en YPD (medio sin tratamiento) (E).

Se efectuaron comparaciones entre el hidrolizado de quinua roja y el grupo control sin tratamiento y con agente oxidante, entre los antioxidantes de referencia evaluados, vitamina C y resveratrol, y el grupo control sin tratamiento y con agente oxidante, y entre el hidrolizado de quinua roja y los antioxidantes de referencia. Se seleccionó una única dosis por compuesto, que podría ser distinta para cada grupo, siendo esta dosis la que mayor diferencia estadística mostró frente al control. El hidrolizado de quinua roja exhibió una capacidad de carga (k) significativamente mayor respecto a la vitamina C, al resveratrol y al control en medio YPOxD (Ctrl(OxD)) en las dosis evaluadas (Figura 19).



**Figura 19.** Evaluación de la capacidad de carga (k) del grupo control con tratamiento oxidante (Ctrl-OxD), el resveratrol, la vitamina C (vitC) y el hidrolizado de quinua roja (Qr2). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. Las comparaciones con diferencias significativas se indican con letras diferentes ( $p < 0,05$ ).

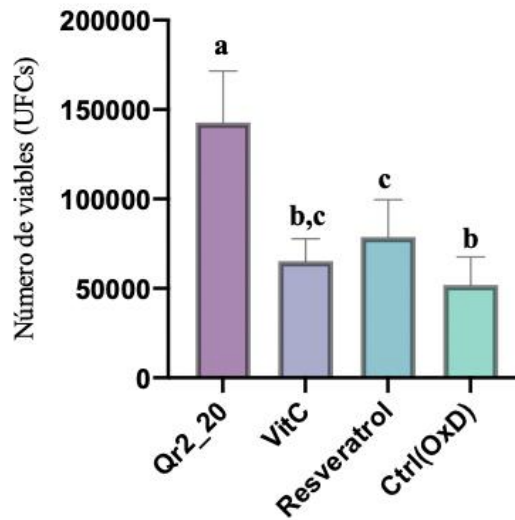
Asimismo, el hidrolizado de quinua roja logró una tasa de crecimiento ( $r$ ) significativamente mayor frente al control YPOxD (Ctrl (OxD)), pero no se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre el hidrolizado de quinua roja y la vitamina C o el resveratrol (Figura 20).



**Figura 20.** Evaluación de la tasa de crecimiento  $r$  ( $h^{-1}$ ) del grupo control con tratamiento oxidante (Ctrl-OxD), el resveratrol, la vitamina C (vitC) y el hidrolizado de quinua roja (Qr2). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. Las comparaciones con diferencias significativas se indican con letras diferentes ( $p < 0,05$ ).

En el recuento de viables o UFCs se observó un número de viables significativamente superior cuando el medio de cultivo se suplementó con quinua roja hidrolizada que cuando se suplementó con resveratrol o vitamina C. También se constató un recuento de viables significativamente superior entre el hidrolizado de quinua y el Ctrl(OxD), y este último

grupo mostró un número de recuento de viables similar a los agentes antioxidantes utilizados vitamina C y resveratrol (Figura 21).



**Figura 21.** Evaluación del número de viables o UFCs del grupo control con tratamiento oxidante (Ctrl-OxD), el resveratrol, la vitamina C (vitC) y el hidrolizado de quinua roja (Qr2). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. Las comparaciones con diferencias significativas se indican con letras diferentes ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el hidrolizado de quinua roja presenta una elevada actividad antioxidante, puesto que exhibió una importante recuperación de la biomasa producida, de la tasa de crecimiento y del número de viables. Los procesos metabólicos de las células desencadenan la producción de EROs que ocasionan un daño celular tanto a nivel estructural como funcional (Takagi & Kitagaki, 2015). Las levaduras poseen sistemas de respuesta ante el estrés oxidativo. En concreto, diferentes factores de transcripción como Yap1, Skn7 y Msn2/4 modulan la respuesta al estrés oxidativo en *S. cerevisiae* (Morano et al., 2012). Estos factores están involucrados en la expresión y/o activación de los antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa, o las tioredoxinas, y por tanto, en la detoxificación del exceso intracelular de EROs y en la normalización del pH interno (Takagi & Kitagaki, 2015). Sin embargo, aunque la célula posee mecanismos de defensa intracelular frente a las EROs, una acumulación excesiva de las mismos puede terminar superando la capacidad antioxidante de estos mecanismos, y desencadenar en una disrupción del *equilibrio redox* provocando daños celulares en el ácido desoxirribonucleico (ADN), en los lípidos y en las proteínas. En este sentido, es necesario considerar que, al estrés oxidativo vinculado a los propios procesos metabólicos de las células, en nuestro trabajo se añade el aplicado de forma exógena ( $H_2O_2$ ), lo que podría suponer exceder la

capacidad antioxidante de los mecanismos de defensa. Teniendo en cuenta esta información, se puede sugerir que el incremento de biomasa o capacidad de carga, que puede estar asociado con un incremento del metabolismo celular y el incremento de EROs no impactó de forma negativa sobre la tasa de crecimiento ni en el número de viables, sino más bien todo lo contrario, lo que sugiere un adecuado equilibrio redox.

La bibliografía respecto al potencial antioxidante de otras matrices alimentarias o hidrolizados de proteínas de origen vegetal utilizando *S. cerevisiae* como modelo experimental es muy limitada. Un cacao enriquecido en polifenoles ha demostrado ejercer efectos antioxidantes en el mismo organismo modelo empleado. Este cacao enriquecido en polifenoles incrementó la tolerancia al estrés oxidativo cuando se comparó con los controles cultivados en YPD. Sin embargo, en este caso la tasa de supervivencia fue inferior al antioxidante de referencia (vitamina C) (Martorell et al., 2011). Por lo tanto, se podría sugerir que nuestro hidrolizado de quinua roja presenta una magnitud de cambio superior, dado que la tasa de recuperación de los parámetros de crecimiento superó a los observados con la vitamina C. De todos modos, es importante matizar que en dicho estudio se testaron dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cuales difieren de las empleadas con nuestro hidrolizado de quinua roja. Por lo tanto, estos hallazgos deberían reafirmarse utilizando las mismas condiciones de estrés oxidativo. Otro compuesto que ha evidenciado un potencial antioxidante utilizando el mismo organismo modelo es el hiperósido o 3-O-galactósido de quercetina. Este flavonoide incrementó un 30-60% la tasa de supervivencia de células sometida a un agente oxidante (CCl<sub>4</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en distintas cepas isogénicas de *S. cerevisiae*. La cepa isogénica deficiente del gen asociado a la expresión de catalasa citosólica T1 (CCT1) exhibió una respuesta más modesta que el resto de cepas utilizadas (deficientes en el gen de la superóxido dismutasa, del glutatión, del glutatión transferasa 1 o de la glutatión transferasa 2). Por tanto, estos resultados sugieren que el efecto protector del hiperósido frente al estrés oxidativo inducido por CCl<sub>4</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría estar mediado en parte por la acción de la catalasa, involucrada en el paso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para generar H<sub>2</sub>O o O<sub>2</sub> (Gao et al., 2019). Las distintas fracciones peptídicas aisladas de un hidrolizado de proteínas de chía han evidenciado un efecto antioxidante en un modelo de *S. cerevisiae*. En concreto, los péptidos derivados del hidrolizado de chía producidos por la adición secuencial de Alcalasa 2.4 LFG y Flavourzyme 1000L incrementaron la tasa de supervivencia de las células expuestas a un agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un 27% comparado con el control (en ausencia de un agente antioxidante). Esta actividad antioxidante *in vivo* del hidrolizado fue reportada en la fracción

peptídica menor de 3 kDa, y fue superior a la observada en las fracciones con un peso molecular superior (3-10 kDa) obtenidas de los hidrolizados con Alcalasa 2.4 LFG y Flavourzyme 1000L, lo que corrobora también en este modelo el mayor potencial antioxidante de los péptidos con un bajo peso molecular (Silveira Coelho et al., 2019). También se ha evaluado la actividad antioxidante de diversos polifenoles de síntesis. Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de la actividad antioxidante, utilizando el ensayo ORAC, que es el mismo procedimiento analítico empleado en esta Tesis Doctoral. Los polifenoles que mostraron mayor actividad antioxidante *in vitro* fueron puestos a prueba en un modelo de *S. cerevisiae* BY4741, y lograron una recuperación de las funciones biológicas de la levadura (Pérez de Vega et al., 2020).

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado *in vivo* las propiedades antioxidantes del hidrolizado de quinua roja seleccionado que se habían descrito previamente en ensayos *in vitro*. Esto es importante ya que la biodisponibilidad, reactividad y estabilidad de un determinado compuesto *in vivo*, puede modificarse con respecto a la capacidad antioxidante observada *in vitro*, y estos resultados nos permiten continuar con la investigación del potencial efecto antioxidante del hidrolizado de quinua roja sobre alguna patología relacionada con el estrés oxidativo, como es la HTA, con el objetivo de continuar investigando su potencial efecto beneficioso sobre la salud.

#### **4.3. Efecto del consumo de hidrolizados de quinua en un modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas**

A pesar de los diferentes procesos involucrados en la etiopatogenia de la HTA, el estrés oxidativo, debido al incremento de EROs, representa uno de los factores clave en el origen y desarrollo de esta condición (Touyz et al., 2020; Griendling et al., 2021). Este desbalance en el equilibrio redox está relacionado con el desarrollo de la disfunción endotelial y del remodelado cardiovascular, ambos procesos característicos también de la HTA (Hamza & Dyck, 2014). Por ello, el estudio de compuestos alimentarios con potencial antioxidante constituye una de las áreas de investigación más emergentes para hacer frente al estrés oxidativo y a sus complicaciones y patologías derivadas, como estrategia o alternativa terapéutica en la prevención y/o el tratamiento de la HTA (Baradaran et al., 2014). En los últimos años, diferentes estudios realizados en humanos han descrito cómo la ingesta de quinua puede ejercer un efecto beneficioso sobre distintos factores de riesgo cardiovascular



como es el exceso de adiposidad, la alteración del perfil lipídico o la HTA (Singh & Singh, 2016; Karimian et al., 2020). En este contexto, el empleo de procedimientos tecnológicos que permitan la liberación de péptidos bioactivos presentes en las proteínas de la quinua, puede ser de gran interés en la formulación de productos con unas propiedades funcionales mejoradas a las ya reportadas en la matriz original.

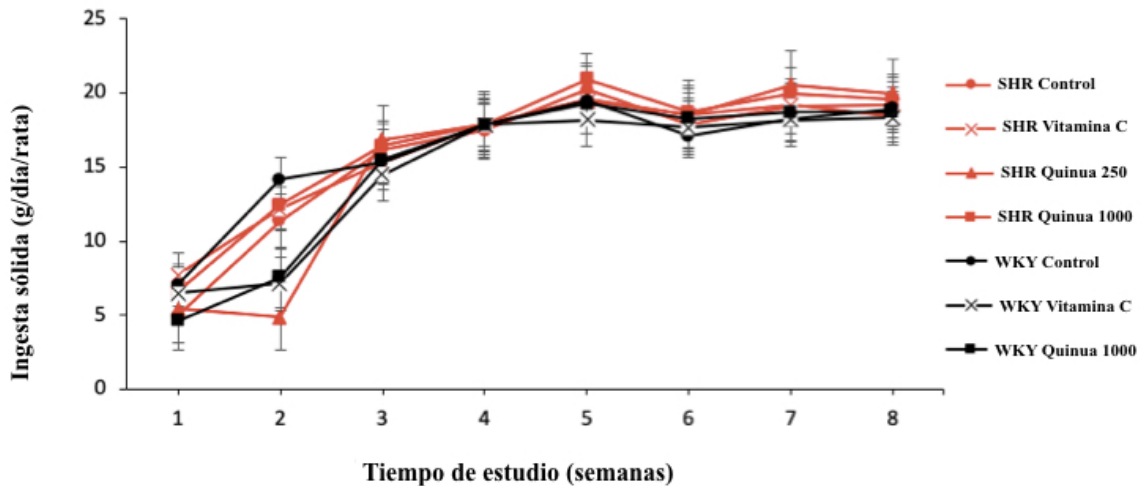
Ya se comentó en la Introducción, entre los pasos necesarios para el desarrollo de un alimento funcional es necesario comprobar mediante estudios en modelos experimentales la efectividad de un compuesto antes de proceder a su comercialización. Los ensayos realizados en levaduras son de gran interés como primera aproximación *in vivo*, sin embargo, para la evaluación de desenlaces fisiológicos como puede ser la presión arterial se requiere aún de modelos animales superiores. Por ello, se decidió investigar el potencial antihipertensivo del hidrolizado de quinua roja en un modelo murino de HTA. En esta Tesis Doctoral, se ha empleado un modelo de HTA de origen genético, la rata SHR. Estos animales, como ya se desarrolló en el apartado 1.4.2, son ampliamente empleados en investigación para el estudio de la HTA, ya que, la progresión de la enfermedad es muy similar a la que acontece en la especie humana, debido a un aumento de las resistencias vasculares periféricas. Además, en el diseño experimental de este trabajo se incluyeron ratas WKY, como control normotenso para conocer si el efecto antihipertensivo es exclusivo de la condición de HTA.

Inicialmente se mostrarán y discutirán los resultados relativos a los registros de las ingestas sólidas y líquidas. A continuación, se presentarán y justificarán los resultados correspondientes a los registros del peso corporal y del peso de los órganos de los animales tras la finalización del estudio.

#### **4.3.1. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja sobre la ingesta y la composición corporal**

En lo que respecta a la ingesta sólida, no se observaron diferencias significativas entre las ratas WKY y SHR a lo largo del estudio, ni tampoco entre los distintos grupos experimentales de cada una de las cepas de animales estudiadas (Figura 22). De forma general, todos los animales incrementaron su ingesta sólida desde el comienzo del estudio hasta la semana 5, momento a partir del cual, dicha ingesta se estabilizó en todos los grupos experimentales, con un consumo promedio de 450-550 g/semana. Esta estimación de la ingesta sólida semanal supone un consumo diario de 19-24 g/rata/día, lo que se encuentra

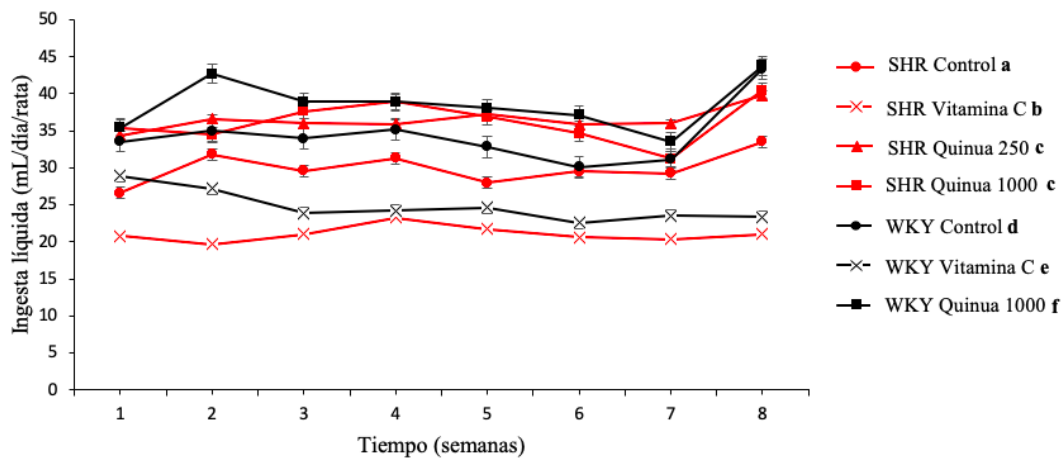
dentro de un rango de ingesta sólida habitual de 14-35 g/día de acuerdo a la bibliografía (Espinoza & Martínez, 2001; Boon et al., 2013). En la semana 2 del estudio se observó una ligera desviación en la ingesta sólida entre grupos, que podría justificarse por el periodo de adaptación de las ratas a los diferentes tratamientos y procedimientos (acostumbramiento al test de Von frey y a la medida de presión arterial), realizados en los animales al comienzo del estudio.



**Figura 22.** Seguimiento de la **ingesta sólida** en los distintos grupos experimentales a lo largo del estudio. Se evaluó la ingesta sólida de las ratas SHR (color rojo): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día), (▲) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color negro): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día) y (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día). Los datos representan los valores medios ± EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías seguido de un test post-hoc de Bonferroni. No existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales a lo largo del periodo de estudio a excepción de la semana 2 ( $p < 0,05$ ).

En lo que respecta a la ingesta líquida se evidencia un consumo relativamente estable a lo largo del estudio en los diferentes grupos, aunque con diferencias de consumo entre los mismos (Figura 23). Se observó que las ratas WKY tuvieron una ingesta líquida significativamente superior a la de las ratas SHR ( $p < 0,05$ ). Esto podría ser debido, al menos en parte, a que presentaron un mayor tamaño corporal como es habitual en esta cepa de animales que suele ser superior en tamaño a las SHR de la misma edad, aunque como veremos más adelante no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas. Sin embargo, en el caso del tratamiento con vitamina C, la ingesta líquida fue similar entre los grupos SHR y WKY, y significativamente inferior que la observada en el resto de grupos control o con tratamiento de hidrolizado de quinua roja ( $p < 0,05$ ). Esta situación podría ser

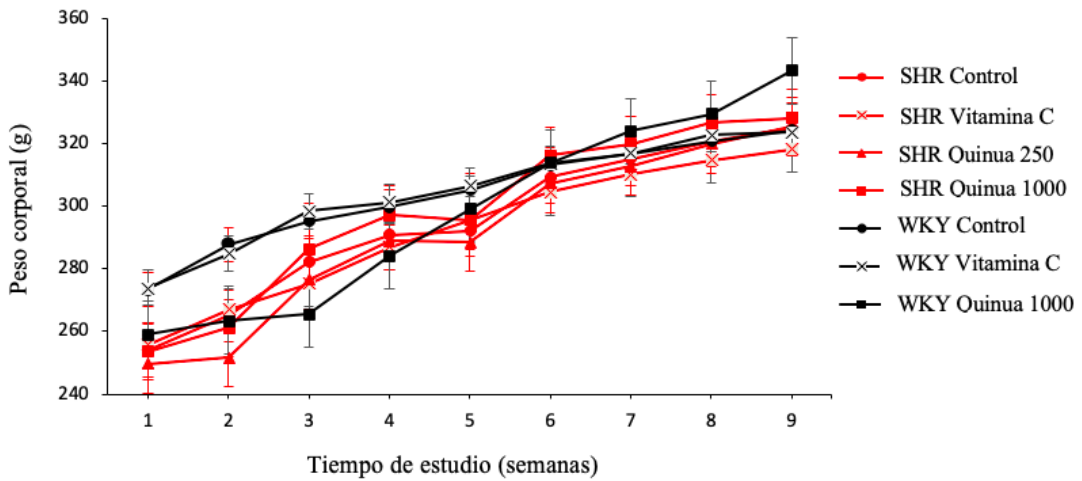
ocasionada por el sabor ácido característico de la vitamina C, lo que puede suponer una reducción de la ingesta de bebida en el grupo de ratas que lo consumen. Por el contrario, la ingesta líquida de los grupos de ratas tanto WKY como SHR tratadas con el hidrolizado de quinua roja fue significativamente superior a la de sus respectivos grupos control ( $p < 0,05$ ). De forma habitual, los hidrolizados obtenidos de proteínas alimentarias se suelen caracterizar por generar sabores amargos, lo que podría afectar de forma negativa a su ingesta (Saha & Hayashi, 2001; Liu et al., 2014). Sin embargo, en el desarrollo y selección del hidrolizado de quinua roja empleado en este estudio se consideraron los aspectos sensoriales a la hora de seleccionar el hidrolizado con la finalidad de obtener un producto con unas características organolépticas adecuadas. De hecho, el hidrolizado de quinua roja utilizado en la evaluación *in vitro* fue seleccionado además de por su potencial antioxidante, por presentar un sabor agradable con notas dulces, que podría explicar la mayor ingesta líquida observada en el grupo de ratas tratadas con hidrolizado de quinua al resultar más palatable. De hecho, y de acuerdo a la bibliografía, se ha descrito cómo las ratas presentan aversión a determinados sabores, entre los que destacan el ácido y el amargo, y tienen una mayor predilección por sabores dulces o salados (Tordoff et al., 2008), lo que puede justificar la tendencia observada en este estudio en los diferentes grupos experimentales en función del sabor de cada uno de los tratamientos.



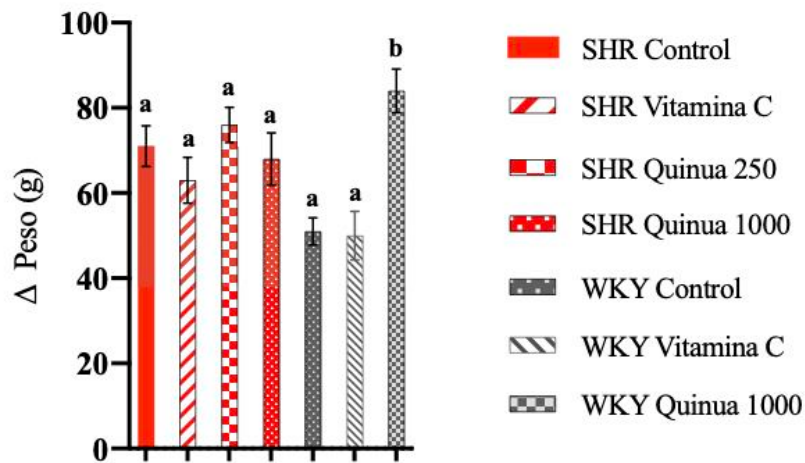
**Figura 23.** Evolución de la **ingesta líquida** en los distintos grupos experimentales *a lo largo del estudio*. Se evaluó la ingesta líquida de las ratas SHR (color rojo): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día), (▲) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color negro): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día) y (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

En relación al peso corporal, se observó un aumento progresivo del mismo en las ratas SHR y WKY desde el comienzo del periodo experimental hasta la finalización del estudio (Figura 24). Las ratas SHR presentaron un peso corporal ligeramente inferior al de las ratas WKY al inicio del tratamiento, aunque no se observaron diferencias significativas entre las diferentes cepas. De acuerdo a lo descrito en el apartado de la introducción 1.3.2, los sujetos con HTA manifiestan de forma general un peso corporal superior a los individuos normotensos, en el caso de la especie humana. Sin embargo, en el caso de ratas SHR se observa la tendencia opuesta, ya que presentan un peso inferior a sus controles normotensos. En las ratas SHR, la menor ganancia de peso respecto al grupo de ratas WKY se asocia con un deterioro general de la salud como consecuencia del desarrollo de HTA (Bakker et al., 2014; Raji et al., 2016). En las dos primeras semanas de estudio se apreció un menor incremento del peso corporal en el grupo WKY y SHR que recibieron 1000 mg/kg/día y 250 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja, respectivamente, posiblemente ocasionado por la adaptación de algunos animales al tratamiento. Una vez transcurrido este periodo inicial, los animales de estos grupos recuperaron esa diferencia de peso inicial.

Cuando analizamos la ganancia de peso corporal de cada uno de los grupos del estudio, se observó un incremento de 84 g en el grupo de animales WKY que recibieron la dosis de 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja, comparado con un aumento de 51 g en el grupo de ratas WKY control que bebieron agua, siendo dichas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Esta tendencia no se observó en el caso de las ratas SHR, y el aumento del peso corporal fue similar en los grupos de animales a los que se administró hidrolizado de quinua roja y en los animales del grupo control que bebieron agua. En el caso de los grupos a los que se administró vitamina C tanto en ratas SHR como en WKY, la ganancia de peso reportada alcanzó una magnitud inferior, aunque sin diferencias significativas, a los animales de su respectivo grupo control (Figura 25).



**Figura 24.** Seguimiento del peso corporal en los animales de experimentación. Se registró el peso corporal de ratas SHR (color rojo): (♦) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día), (▲) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color negro): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día) y (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día). Los datos representan los valores medios ± EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de 2 vías, con test post hoc de Bonferroni. No existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales a lo largo del periodo de estudio a excepción de la semana 2 entre el grupo de ratas WKY con 250 mg/kg/día vitamina C y 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja ( $p < 0,05$ ).



**Figura 25.** Ganancia del peso corporal de los animales al final del tratamiento respecto a su peso inicial. Se evaluó la ganancia de peso de las ratas SHR (color rojo): (■) control (agua destilada), (▨) vitamina C (250 mg/kg/día), (▩) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y (▧) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color gris): (■) agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C y (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los valores representan los valores medios ± EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Además del peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales, también se evaluó el peso de los distintos órganos con el fin de encontrar posibles diferencias relacionadas con el tratamiento. Es habitual presentar los datos de peso de los órganos ajustado por el peso corporal del animal para corregir posibles diferencias que pudieran aparecer en el peso de los órganos como consecuencia de un mayor o menor tamaño de los animales de los diferentes grupos (Tabla 17). De forma general, los órganos analizados mostraron un peso similar en los grupos de ratas WKY y SHR indistintamente del tratamiento administrado, a excepción del hígado. En este sentido se observó que el grupo de ratas SHR tratadas con la dosis más alta del hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día) presentó un peso relativo de dicho órgano inferior respecto a su grupo control ( $p < 0,05$ ). En ratas SHR se ha descrito que el aumento de la tensión arterial se asocia con un incremento del ratio hígado/peso corporal (Arima et al., 2014). Esto podría ser debido a que el estrés oxidativo se encuentra íntimamente ligado a la HTA, que induce a su vez alteraciones estructurales y funcionales a nivel hepático (Ikuta et al., 2012). Ante esta situación, los compuestos antioxidantes como el resveratrol han demostrado la capacidad de reducir los niveles de MDA, relacionados con la peroxidación lipídica, e incrementar la capacidad antioxidante del tejido hepático, lo que en última instancia supone una mejoría de los daños estructurales de dicho tejido (Jalili et al., 2019). En nuestro estudio las diferencias significativas observadas a nivel del peso relativo del hígado en las ratas SHR sugieren la capacidad del hidrolizado de quinua para atenuar los cambios estructurales y/o funcionales que ocurren en este tejido y que están asociados al desarrollo de la HTA.

**Tabla 17.** Peso total de los órganos obtenidos de las ratas tras la finalización del estudio. Los datos representan los valores medios (g) ± EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos

<i>Grupos experimentales</i> <i>Peso órganos</i>	<i>SHR Control</i>	<i>SHR Vitamina C</i>	<i>SHR Quiua roja 250 mg/kg/día</i>	<i>SHR Quiua roja 1000 mg/kg/día</i>	<i>WKY Control</i>	<i>WKY Vitamina C</i>	<i>WKY Quiua roja 1000 mg/kg/día</i>
<b>Cerebro (g)</b>	0,69 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,63 ± 0,03	0,64 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,66 ± 0,02
<b>Corazón (g)</b>	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01
<b>Pulmón (g)</b>	0,52 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,52 ± 0,03
<b>Hígado (g)</b>	3,35 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,13 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,12 <sup>ab</sup>	2,91 ± 0,12 <sup>b</sup>	2,94 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b>Bazo (g)</b>	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01
<b>Riñón (g)</b>	0,81 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,74 ± 0,05	0,78 ± 0,05	0,69 ± 0,11	0,78 ± 0,03	0,69 ± 0,09
<b>Tejido adiposo epididimal (g)</b>	1,33 ± 0,05	1,22 ± 0,08	1,29 ± 0,07	1,40 ± 0,06	1,41 ± 0,06	1,33 ± 0,07	1,42 ± 0,04
<b>Músculo (g)</b>	0,11 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
<b>Tibia (g)</b>	1,13 ± 0,02	1,16 ± 0,03	1,11 ± 0,02	1,14 ± 0,04	1,09 ± 0,06	1,16 ± 0,03	1,09 ± 0,03

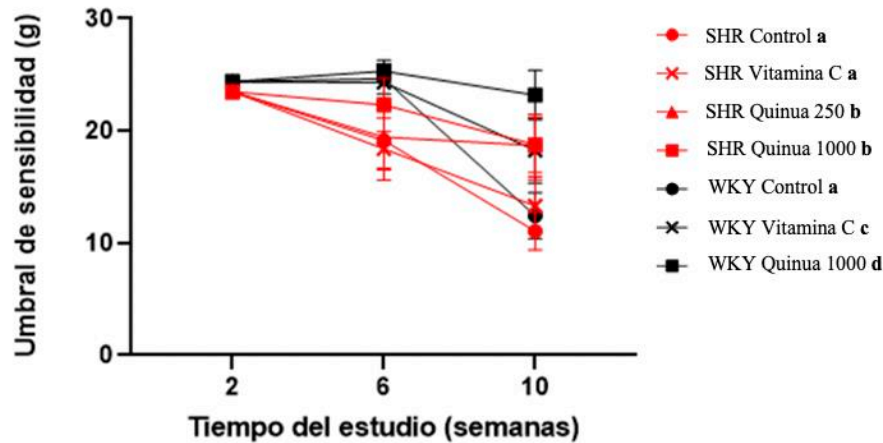
#### **4.3.2. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja sobre el desarrollo de neuropatía periférica**

Numerosos estudios han resaltado la coexistencia de una elevada presión arterial con la presencia de neuropatías periféricas, un marcador del riesgo de alteraciones metabólicas y de diabetes mellitus tipo II. Por ello, se consideró de interés evaluar el efecto que produce la administración del hidrolizado de quinua roja sobre el desarrollo de neuropatía periférica en nuestro modelo experimental. Para ello, se valoró el umbral de estimulación mecánica y el desarrollo de alodinia táctil o hipersensibilidad de acuerdo al test de los filamentos de *von Frey*. Las ratas WKY de los tres grupos experimentales mantuvieron un umbral de sensibilidad muy estable hasta la semana 6 de estudio, a partir de la cual, se observó un declive significativo en el umbral de estimulación mecánica en las ratas WKY del grupo control que bebieron agua, comparado con el reportado en las ratas tratadas con vitamina C o hidrolizado de quinua roja ( $p < 0,05$ ). Esto implica que la presión mínima a través de un estímulo mecánico capaz de provocar una activación nociceptiva fue inferior en el grupo de ratas control. Esta situación pone de manifiesto en este grupo de animales el desarrollo de alodinia, es decir, la percepción de dolor que provoca la retirada de las patas ante un estímulo táctil no doloroso (Chaplan et al., 1994). La administración de vitamina C en el grupo de ratas WKY atenuó de forma significativa el descenso del umbral de sensibilidad mecánica respecto al grupo control, aunque dicha reducción fue significativamente menor a la observada en el caso del hidrolizado de quinua roja. En este sentido, el tratamiento con el hidrolizado de quinua demostró la mayor efectividad en lo que a mitigación del umbral de sensibilidad mecánica se refiere, con diferencias significativas respecto al grupo control y también al grupo tratado con vitamina C ( $p < 0,05$ ). De acuerdo a lo explicado en el apartado 1.3.2, las ratas WKY son empleadas comúnmente como un modelo experimental de pre-hipertensión, ya que manifiestan un incremento progresivo de la presión arterial conforme transcurren las semanas de vida, aunque dicho aumento ocurre en una magnitud inferior al acontecido en ratas SHR (Tain et al., 2017). Por tanto, estos datos sugieren que el hidrolizado de quinua roja está previniendo el desarrollo de alodinia mecánica en este modelo experimental de ratas pre-hipertensas, lo que indicaría su efectividad incluso antes de llegar a instaurarse de forma definitiva la HTA u otras patologías asociadas al estrés oxidativo.

En relación a las ratas SHR, la sensibilidad mecánica al inicio del estudio fue similar entre los diferentes grupos experimentales. En la figura 26 se puede observar cómo en el



grupo de ratas SHR control el umbral de sensibilidad mecánica disminuye a lo largo de todo el estudio y de forma notable entre la semana 6 y la semana 10, siendo significativamente inferior a lo reportado en las ratas WKY control ( $p < 0,05$ ). Estos hallazgos sugieren que las ratas SHR que bebieron agua, así como los animales tratados con vitamina C desarrollaron en mayor medida alodinia mecánica durante el transcurso del estudio. En el caso del grupo SHR al que se administró 250 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja, el umbral de sensibilidad disminuyó, pero en un grado significativamente inferior que en los grupos anteriormente descritos ( $p < 0,05$ ). En cambio, en las ratas SHR tratadas con las dosis de 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja, los umbrales de estimulación mecánica no se modificaron a lo largo del estudio y permanecieron constantes durante todo el periodo de tratamiento. Estos hallazgos indican que la administración de hidrolizado de quinua roja podría ser de utilidad en la prevención de alteraciones vinculadas con la sensibilidad mecánica como es el caso de la alodinia mecánica. Además, este efecto es dosis-dependiente, ya que, conforme aumenta la dosis del hidrolizado administrado, el umbral de sensibilidad no disminuye. Tanto en modelos animales como en pacientes con HTA, se ha constatado que se produce un estado de hipoalgesia, es decir, una insensibilidad o sensibilidad reducida frente a estímulos nocivos. Sin embargo, el conocimiento acerca de las alteraciones en la sensibilidad frente a estímulos no dolorosos (alodinia), evaluadas en nuestro periodo experimental, es más limitado en estos pacientes. En nuestro estudio, la reducción del umbral de sensibilidad durante el transcurso de la intervención fue mayor en las ratas SHR a la observada en el modelo de rata pre-hipertensas (WKY), lo que sugiere que la propia HTA *per se* estaría involucrada en la susceptibilidad a desarrollar alodinia. Taylor et al., (2001) comprobaron cómo el fenotipo de dolor en ratas SHR depende del estímulo sensorial y el test utilizado, ya que se identificó hipoalgesia tras un test de placa caliente, e hiperalgesia tras un test de retirada de la cola como el empleado en este trabajo. Esta situación es similar a lo que se ha observado en nuestro estudio en el que las ratas con HTA desencadenan una respuesta nociceptiva exagerada ante estímulos no dolorosos y que, por tanto, el empleo de compuestos capaces de mejorar esta condición en origen, podrían ser de utilidad frente a la aparición y desarrollo de alodinia. De esta manera, se evidencia el potencial del hidrolizado de quinua roja frente al desarrollo de neuropatía periférica tanto en los estadios iniciales de la enfermedad (pre-hipertensión) como una vez instaurada la HTA.



**Figura 26.** Umbral de sensibilidad a la estimulación mecánica en los animales a las 2, 6 y 10 semanas de estudio, mediante el test de los filamentos de von Frey. Ratas SHR (color rojo): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día), (▲) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color negro): (●) control (agua destilada), (×) vitamina C (250 mg/kg/día) y (■) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

Los radicales libres provocan un deterioro de los nervios periféricos e incitan un estado de sobreexcitación a los nociceptores aferentes, lo que puede contribuir a la expresión de dolor neuropático (Campbell & Meyer, 2006). Esta situación puede justificar la evidencia emergente acerca de la utilidad, frente al dolor neuropático, de la reducción de la producción excesiva de EROs a través de administración de compuestos antioxidantes (Ji et al., 2017; Shahid et al., 2021). A modo de ejemplo, el tempol, un compuesto con propiedades antioxidantes, demostró atenuar el desarrollo de alodinia mecánica en un modelo experimental de rata con daño neuropático, a través de la inhibición de la producción excesiva de óxido nítrico (Jia et al., 2019). Una elevada producción de óxido nítrico provoca una activación exacerbada de los astrocitos, lo que desencadena una mayor producción de prostaglandinas y el incremento de la excitabilidad neuronal ante diferentes estímulos táctiles (Naik et al., 2006). Otros hidrolizados de distintas matrices proteicas han demostrado su efectividad en la reducción del riesgo de alodinia en diferentes modelos experimentales, y en estos casos se vincularon dichos resultados con mecanismos antioxidantes y de disminución del estado inflamatorio (Gárces-Rimón, 2013; Rizzetti et al., 2016; Martínez et al., 2018; Moreno-Fernández, Garcés-Rimón, et al., 2018).

Por tanto, los resultados obtenidos relativos a la sensibilidad mecánica en las ratas de ambos grupos, WKY y SHR, tratadas con la mayor dosis de hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día) puede ser resultado, al menos en parte, de la reducción en el estrés oxidativo debido al poder antioxidante del hidrolizado objeto de este estudio. Sin embargo, este mecanismo de acción sugerido debe comprobarse a través de un análisis en profundidad de diferentes biomarcadores de estrés oxidativo en las muestras de sangre y órganos extraídos al finalizar el periodo experimental, para profundizar en las vías o mecanismos mediante los cuales estaría actuando el hidrolizado de quinua roja.

#### **4.3.3.Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas**

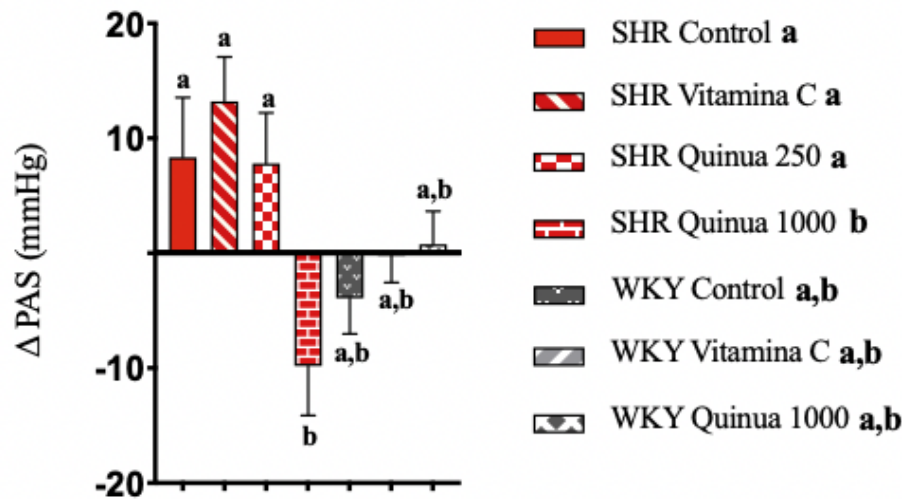
De manera similar a los seres humanos, el estrés oxidativo es precedido por un estado inflamatorio a nivel renal que termina desencadenando en este modelo experimental de ratas hipertensas, a las 2-3 semanas de vida, un incremento sustancial de la presión arterial (Biswas et al., 2007). Por ello, se decidió evaluar si el hidrolizado de quinua modificaba los niveles de presión arterial en estos animales, y para ello se midió de forma indirecta este parámetro a las ratas de todos los grupos, al inicio y al final del periodo de estudio. En relación a este parámetro, al comienzo del estudio (10-12 semanas de vida) se observaron diferencias significativas en la PAS entre las ratas SHR y WKY, manifestando ya a esta edad las ratas hipertensas una PAS superior a la de su control normotenso ( $198 \pm 1,7$  mmHg vs  $157 \pm 2,4$  mmHg;  $p < 0,05$ ). En el caso de las ratas WKY, los animales de los diferentes grupos presentaron una PAS semejante al comienzo del estudio ( $157 \pm 2,4$  mmHg grupo control,  $161 \pm 3,9$  mmHg grupo vitamina C y  $150 \pm 4,0$  mmHg grupo hidrolizado quinua roja 1000 mg/kg/día;  $p > 0,05$ ). Una situación parecida se observó en el caso de los diferentes grupos de ratas SHR y se registró una PAS similar en todos ellos al inicio del estudio ( $198 \pm 1,7$  mmHg grupo control,  $191 \pm 3,2$  mmHg grupo vitamina C,  $200 \pm 2,6$  mmHg grupo hidrolizado quinua roja 250 mg/kg/día, y  $204 \pm 3$  mmHg grupo hidrolizado quinua roja 1000 mg/kg/día;  $p > 0,05$ ).

Como se ha comentado en el apartado 1.3.2, la PAS de las ratas SHR comienza a incrementarse a partir de las 6-7 semanas y alcanza una *fase plateau* entre las 17 y las 20 semanas de vida. Teniendo en consideración este hecho, es interesante destacar los resultados obtenidos al finalizar el estudio. Como se observa en la Tabla 18, en la que se

muestra la modificación de la PAS entre la semana inicial y la semana final del estudio, se evidencian diferencias significativas entre el grupo de ratas SHR tratadas con la dosis más alta del hidrolizado de quinua roja administrada y el resto de los grupos experimentales. En concreto, las ratas SHR tratadas con 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja manifestaron una reducción de la PAS respecto a sus valores iniciales ( $-9,8 \pm 4,5$  mm Hg). Sin embargo, el resto de grupos de animales mostraron un incremento de la PAS característico de este modelo experimental hasta alcanzar el periodo de estabilización descrito anteriormente (Figura 27). Por tanto, estos datos sugieren que la dosis de 250 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja y de vitamina C fueron insuficientes para revertir el aumento de la PAS propio de este modelo experimental. Por otro lado, no se constataron diferencias significativas en la PAS entre los diferentes grupos experimentales de ratas WKY, lo que pone de manifiesto que el efecto antihipertensivo del hidrolizado de quinua roja es propio de la condición de HTA y también puede intervenir en el desarrollo de la misma.

**Tabla 18.** Valores de presión arterial basal y post-intervención en cada uno de los grupos experimentales.

Grupos experimentales	Presión arterial basal	Presión arterial post-intervención	Diferencias presión arterial
SHR Control	198,0 $\pm$ 4,0	206,4 $\pm$ 3,3	8,4 $\pm$ 5,2
SHR Vitamina C	191,7 $\pm$ 3,2	204,9 $\pm$ 1,9	13,2 $\pm$ 3,9
SHR Quinoa 250	199,9 $\pm$ 2,6	207,7 $\pm$ 2,8	7,8 $\pm$ 4,1
SHR Quinoa 1000	203,8 $\pm$ 3,2	193,9 $\pm$ 2,9	-9,8 $\pm$ 4,5
WKY Control	158,4 $\pm$ 3,5	154,4 $\pm$ 3,9	-3,9 $\pm$ 3,1
WKY Vitamina C	161,5 $\pm$ 3,8	161,2 $\pm$ 3,9	-0,22 $\pm$ 2,3
WKY Quinoa 1000	149,5 $\pm$ 4,0	150,4 $\pm$ 2,3	0,7 $\pm$ 2,8



**Figura 27.** Incremento de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) entre el inicio y el final del periodo experimental. Ratas SHR (color rojo): (■) control (agua destilada), (▨) vitamina C (250 mg/kg/día), (▩) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y (▧) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color gris): (■) agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C y (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los datos representan los valores medios  $\pm$ EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos constatan el potencial antihipertensivo del hidrolizado de quinua roja en un modelo experimental de ratas con HTA. Un estudio realizado por nuestro grupo ya demostró los efectos antihipertensivos de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina en el mismo modelo experimental utilizado en este trabajo. Además, de manera similar en las ratas WKY tampoco se produjo una atenuación de la presión arterial (Miguel et al., 2005). Estos efectos se correlacionaron con los resultados en la actividad antioxidante y de inhibición de la ECA *in vitro* que habían sido previamente descritos (Miguel et al., 2004). Del mismo modo, péptidos bioactivos obtenidos a partir de diferentes matrices de origen vegetal también han evidenciado el potencial beneficioso sobre diferentes parámetros de la salud cardiovascular, entre los que se encuentra la modulación de la presión arterial (Kaur et al., 2021). A modo de ejemplo, un hidrolizado de proteína de salvado de arroz fue capaz de reducir tanto la PAS como la PAD de forma aguda, siendo dicha disminución similar a la observada para el compuesto antihipertensivo de referencia como es el captopril (Wang et al., 2017). En la misma línea, otro pseudocereal como el amaranto también ha sido empleado

para la obtención de péptidos bioactivos con potencial antihipertensivo. Ramírez-Torres et al. (2017), encontraron que un hidrolizado de proteína de amaranto con alcalasa, la misma enzima seleccionada en nuestro estudio, en una dosis de 1,2 g/kg fue capaz de inducir una reducción de la PAS en ratas SHR, transcurridas 3 h de la ingesta del hidrolizado, en una magnitud de semejante al reportado por el captopril. Estos resultados son difícilmente contrastables con los nuestros debido a que únicamente se evaluó el impacto del hidrolizado sobre la presión arterial de forma aguda. En nuestro caso se hizo de manera crónica, además de que el tratamiento se administró por vía intra-gástrica, mientras que nosotros lo efectuamos en el agua de bebida del biberón.

El efecto antihipertensivo de hidrolizados de proteínas de quinua también ha sido puesto a prueba, y se ha visto una reducción de la presión arterial entre las 2-6 h tras las administración oral de diferentes tratamientos (Guo, Hao, Fan, et al., 2021). En este caso, se constataron además cambios en la microbiota asociados a la variación de la presión arterial, en concreto, el efecto antihipertensivo de la proteína de quinua fue acompañado por el aumento en la abundancia del género bacteriano *Akkermansia*, *Turibacter* o *Allobaculum*. Estas bacterias están involucradas en la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que contribuyen a la regulación de la presión arterial a través de la modulación inmune o de la inhibición en la actividad de la ECA (Al Khodor et al., 2017). Un hidrolizado de proteínas de quinua con pepsina y pancreatina, simulando así las condiciones de la digestión gastrointestinal, ocasionó una reducción de la presión arterial transcurridas 2-10h tras su administración oral (Guo et al., 2020). Además, dicho hidrolizado exhibió una mayor inhibición de la ECA respecto al control, lo que sugiere que los péptidos bioactivos producidos durante la hidrólisis podrían utilizar este mecanismo para ejercer su efecto antihipertensivo. De acuerdo a la bibliografía, la quinua cocinada ha demostrado en ratas con HTA ser capaz de incrementar los niveles de la superóxido dismutasa y catalasa, enzimas clave en la detoxificación de EROs (Cisneros-Yupanqui et al., 2020). Por lo tanto, parece razonable sugerir que la liberación de péptidos antioxidantes presentes en la quinua podría potenciar en mayor medida estos efectos sobre distintas enzimas involucradas en el equilibrio redox.

#### **4.3.4. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en biomarcadores de estrés oxidativo en ratas espontáneamente hipertensas**

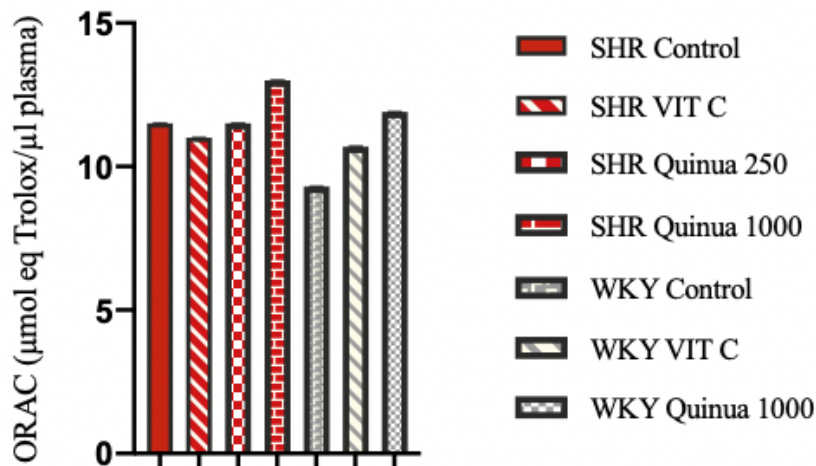
Como se ha desarrollado en el apartado 1.2.1 de la introducción de esta Tesis Doctoral, la producción de EROs como consecuencia del metabolismo celular y de distintos contaminantes ambientales, es contrarrestada por los diferentes mecanismos de defensa antioxidante del organismo. Sin embargo, cuando la concentración de estos compuestos altamente reactivos supera la capacidad de neutralización de los sistemas antioxidantes, se producen alteraciones celulares vinculadas con numerosas enfermedades y entre ellas con el riesgo de HTA.

Para evaluar el grado de estrés oxidativo en los animales del estudio se determinó la capacidad antioxidante en muestras de plasma, hígado, corazón, aorta y riñón, los niveles de glutatión en hígado y las concentraciones de MDA en plasma, hígado, corazón, aorta y riñón.

##### **4.3.4.1. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la capacidad antioxidante del plasma**

La determinación de la capacidad antioxidante total de muestras biológicas puede efectuarse con distintos métodos analíticos, entre los que encontramos el ensayo ORAC. Este ensayo nos permite cuantificar la capacidad de una muestra para neutralizar radicales peroxilo que, como ya se explicó en el apartado 4.1, al ser un radical fisiológico es de gran interés para evaluar el potencial efecto de un compuesto antioxidante en el organismo. En relación a la capacidad antioxidante en el plasma de los animales, se pudo comprobar que el grupo de ratas SHR control mostró unos valores de ORAC superiores a los observados en las ratas WKY que bebieron agua (Figura 28). Este resultado podría relacionarse con un incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes como mecanismo de defensa endógeno vinculado a la mayor producción de EROs que acontece en la HTA. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, probablemente debido a la duración de la intervención. Asimismo, los grupos de ambas cepas tratados con el hidrolizado de quinua roja experimentaron un aumento de la capacidad antioxidante en relación a sus respectivos grupos control. Además, esta respuesta podría tener un efecto dosis-dependiente dado que el

efecto fue más pronunciado tras la administración de la mayor dosis del hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día). Aunque estas diferencias no llegaron a ser significativas, esta tendencia sugiere que la ingesta del hidrolizado de quinua roja puede ser de gran interés para aumentar los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo. En este sentido, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación evidenció el potencial de un hidrolizado de clara de huevo para aumentar la capacidad antioxidante del plasma de ratas Zucker obesas (Garcés-Rimón, 2014). Del mismo modo, un hidrolizado de proteína de cáñamo ocasionó un incremento de la capacidad antioxidante plasmática en ratas SHR, corroborando las propiedades antioxidantes *in vitro* reportadas previamente. Los investigadores pudieron confirmar que estos efectos estaban ligados con la inducción de la actividad plasmática de la catalasa, enzima que desempeña un papel crucial en la eliminación de compuestos que promueven el estrés oxidativo (Girgih et al., 2014). En este sentido se han planteado más análisis en el plasma de los animales de este estudio con el objetivo de intentar averiguar cuál es el mecanismo o vía de señalización implicada en el efecto antioxidante del hidrolizado de quinua roja a nivel sistémico.



**Figura 28.** Actividad antioxidante plasmática evaluada mediante la captación de radicales de peroxilo (ORAC) en los grupos experimentales al finalizar el estudio. Ratas SHR (color rojo): (■) control (agua destilada), (▨) vitamina C (250 mg/kg/día), (▩) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y (▧) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color gris): (■) agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C y (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los datos representan los valores medios (g) ± EEM para los 8 animales de cada grupo. ORAC (Oxigen-Radical Absorbance Capacity). ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. No existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales a lo largo del periodo de estudio ( $p > 0,05$ ).



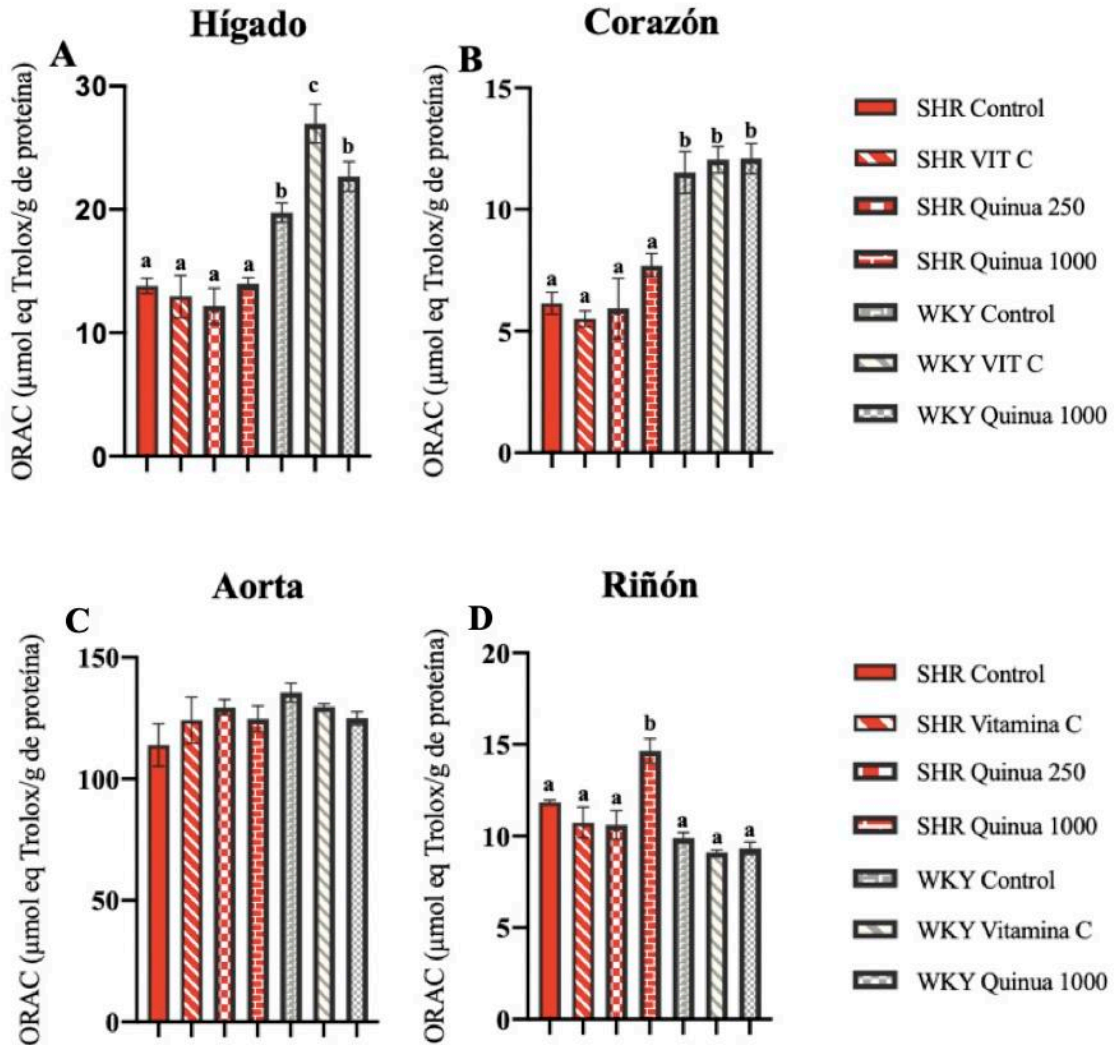
#### 4.3.4.2. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la capacidad antioxidante del hígado, corazón, aorta y riñón

Del mismo modo, en este estudio se analizó el efecto de la administración del hidrolizado de quinua roja en diferentes órganos diana de la HTA, para conocer si existe un incremento de los mecanismos de defensa antioxidante propios de cada tejido. La capacidad antioxidante de los diferentes órganos analizados se muestra en la Figura 29. En lo que respecta al hígado (figura 29A), los valores ORAC del grupo de ratas SHR control fueron significativamente inferiores a los observados en su control normotenso WKY ( $p < 0,05$ ). En estudios previos se ha evidenciado una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes del hígado en este modelo experimental (Binda et al., 2001; Duarte et al., 2001). La administración de vitamina C o de hidrolizado de quinua roja en las ratas WKY ocasionó un aumento de la capacidad antioxidante comparado con el grupo control, aunque dicho incremento fue significativo únicamente en el caso del tratamiento con vitamina C ( $p < 0,05$ ). En el caso de las ratas SHR, en todos los grupos experimentales se observó una capacidad antioxidante similar respecto a su grupo SHR control ( $p > 0,05$ ). Lee et al. (2012), demostraron que los compuestos antioxidantes de la cebolla roja provocaron un aumento de los valores de actividad antioxidante en el hígado, aunque al igual que en nuestro estudio, dicho incremento no fue significativo respecto al grupo control. Estos autores postularon que la mejora de la capacidad antioxidante hepática podría estar vinculada con la inducción de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa.

En el caso del corazón (Figura 29B), de forma similar a lo observado en el hígado, las ratas WKY del grupo control exhibieron una mayor capacidad antioxidante respecto a las ratas SHR correspondientes al mismo grupo. Sin embargo, en el grupo de ratas WKY la administración de vitamina C o hidrolizado de quinua roja no provocó un aumento significativo de la capacidad antioxidante respecto al control. Una tendencia similar ocurrió en el grupo de ratas SHR ya que el tratamiento con vitamina C o con hidrolizado de quinua roja tampoco ocasionó un incremento significativo de la capacidad antioxidante respecto a su grupo control ( $p > 0,05$ ).

En lo que respecta a la aorta, los valores ORAC observados fueron similares en ratas WKY y SHR, y tampoco hubo diferencias en cada uno de los grupos experimentales entre sí, sin diferencias significativas asociadas a la administración del tratamiento con vitamina C o con hidrolizado de quinua roja (Figura 29C).

En el riñón se observó una capacidad antioxidante similar en las ratas WKY y las ratas SHR. Asimismo, tras administración de vitamina C o de hidrolizado de quinua roja en las ratas WKY no se evidenciaron diferencias en la capacidad antioxidante. En cambio, el riñón de las ratas SHR tratadas con la dosis más alta de hidrolizado de quinua roja exhibió una mayor capacidad antioxidante que el resto de grupos experimentales (Figura 29D). Sin embargo, la administración de vitamina C o la dosis más baja de hidrolizado de quinua no reportó cambios en la capacidad antioxidante respecto al grupo control de ratas SHR. El riñón constituye un órgano diana de la HTA, y el daño vascular inicial ocasiona una hipertrofia compensatoria a nivel renal. Esta situación termina desencadenando el colapso de algunos glomérulos, lo que provoca una hiperfiltración para mantener la homeostasis renal y finalmente una proteinuria y glomeruloesclerosis, es decir, la alteración de la estructura y funcionalidad de dicho órgano (Hultström, 2012). En ratas SHR se ha identificado que la filtración glomerular disminuye un 20% a las 15 semanas de vida, mientras que el desarrollo de glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial ocurre alrededor de la semana 50 de vida (Hosszu et al., 2021). Por tanto, la limitada duración de nuestro estudio, si atendemos al periodo de latencia de las alteraciones renales vinculadas a la HTA, podría explicar al menos en parte que no existieran diferencias en la capacidad antioxidante entre el grupo de ratas SHR y WKY control. A diferencia de lo sucedido en el resto de órganos, el hidrolizado de quinua roja provocó en el riñón un aumento de la capacidad antioxidante, lo que sugiere que la administración del hidrolizado podría suponer una mejora en el mecanismo de defensa frente a las posibles alteraciones a nivel renal ocasionadas por el estrés oxidativo vinculado a la HTA. De acuerdo a la bibliografía, otros compuestos antioxidantes han demostrado también un incremento de la capacidad antioxidante intracelular a nivel renal. A modo de ejemplo, los flavonoides de la *Garcinia kola* ocasionaron en el riñón un incremento de los valores ORAC en un modelo de rata diabética. En este caso, el incremento de la capacidad antioxidante se asoció con una mayor concentración de glutatión reducido, ya que no se observaron cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes analizadas como la catalasa y la superóxido dismutasa (Ayepola et al., 2014).



**Figura 29:** Capacidad antioxidante del hígado (A), corazón (B), aorta (C) y riñón (D) evaluada mediante la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) de los grupos experimentales al finalizar el estudio. Este ensayo mide la capacidad de los compuestos presentes en una muestra para neutralizar los radicales peroxilo, derivados de la descomposición térmica del azobis (2-metilpropionamidina) diclorato (AAPH) y que desencadenan la oxidación de la fluoresceína utilizada como sustrato. Ratas SHR (color rojo): (■) control (agua destilada), (▨) vitamina C (250 mg/kg/día), (▩) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y (▧) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color gris): (■) agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C y (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los datos representan los valores medios ( $g \pm \text{EEM}$ ) para los 6-8. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ). En el caso de la actividad antioxidante de la aorta no existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales a lo largo del periodo de estudio ( $p > 0,05$ ).

El estrés oxidativo a nivel renal ocasiona el remodelado vascular y el incremento de la resistencia preglomerular, ambos factores clave en el desarrollo de HTA (Xu et al., 2020). En este sentido, se han descrito diferentes mecanismos implicados en esta relación como el incremento de la vasoconstricción renal, el aumento en la liberación de renina o la mayor activación de los nervios aferentes del riñón. El incremento del radical superóxido a nivel renal, desencadena una disfunción vascular y disrupción de la homeostasis del agua y del sodio (Araujo & Wilcox, 2014). El siguiente paso en este sentido consiste en descifrar los mecanismos de defensa intracelular a través de los cuales el hidrolizado de quinua roja produce ese incremento sustancial de la capacidad antioxidante en el tejido renal.

En conjunto, los resultados obtenidos en relación a los valores ORAC de los diferentes tejidos analizados ponen de manifiesto como la HTA en estos animales concurre con un deterioro de la capacidad antioxidante del hígado y del corazón, y en el caso del riñón, el empleo del hidrolizado de quinua roja podría ser de interés para potenciar los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo característico de la HTA.

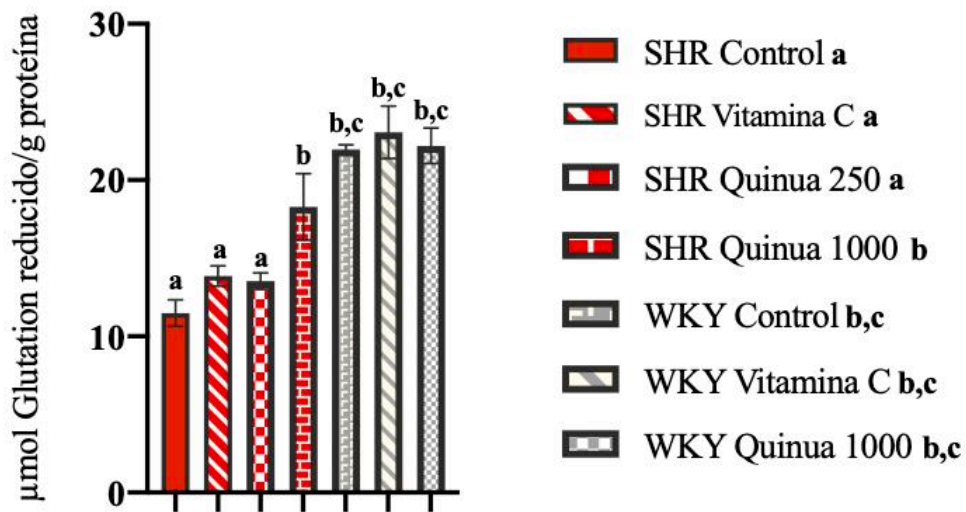
#### **4.3.4.3. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en los niveles de glutatión reducido del hígado**

El glutatión es un tripéptido constituido por L-cisteína, L-ácido glutámico y glicina, que constituye el principal compuesto antioxidante intracelular (Gaucher et al., 2018). Este compuesto ejerce su acción antioxidante a diferentes niveles: de forma directa neutralizando EROs e indirectamente al actuar como sustrato de la glutatión peroxidasa, enzima involucrada en la conversión de  $H_2O_2$  a dos moléculas de  $H_2O$ . Además, el glutatión tiene un papel importante en la detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos (Allocati et al., 2018). Podemos diferenciar dos formas de este compuesto: la reducida o activa con potencial antioxidante, y la oxidada que es inactiva. Esta última forma es el producto de la reacción en la que interviene la glutatión peroxidasa para contrarrestar el estrés oxidativo, por lo que un exceso de EROs puede reducir de forma drástica los niveles de glutatión reducido. El ratio glutatión reducido:oxidado es utilizado como marcador de toxicidad celular. De tal forma, en condiciones normales este ratio se sitúa en 100:1, mientras que en condiciones de estrés oxidativo se produce un desbalance disminuyendo a una relación 10:1 e incluso 1:1. Aunque todos los tipos de células sintetizan glutatión, las células hepáticas son consideradas las principales productoras de este antioxidante no enzimático (Vairetti et al.,

2021). Por este motivo, en este estudio se procedió a analizar los niveles de glutatión reducido en el hígado de los diferentes grupos experimentales y así evaluar el efecto del hidrolizado de quinua roja sobre este tejido.

Tal y como se muestra en la Figura 30, los niveles de glutatión reducido disminuyeron de forma significativa en las ratas SHR control con respecto a su control normotenso ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el desarrollo de HTA en este modelo experimental se encuentra relacionado con la reducción de este compuesto antioxidante, lo que explica en parte la incapacidad para hacer frente al estrés oxidativo y, por tanto, al incremento sostenido de la presión arterial en este modelo experimental. La disminución de los niveles de glutatión reducido se ha descrito ampliamente en pacientes con HTA (Alfonso-Izquierdo et al., 2020), y también se ha sugerido que esto podría terminar desencadenando un incremento del estrés oxidativo y contribuir al desarrollo de eventos cardiovasculares (Bajic et al., 2019). En el caso de las ratas WKY, el tratamiento con vitamina C o el hidrolizado de quinua no logró aumentar los niveles de glutatión reducido respecto al grupo control. Por otro lado, la administración del hidrolizado de quinua roja en una dosis de 1000 mg/kg/día provocó un incremento de los niveles de glutatión reducido comparado con el grupo de ratas SHR control. El consumo del hidrolizado de quinua roja por su carácter antioxidante y en una dosis suficiente podría actuar neutralizando las EROS, e inducir un aumento en la biosíntesis de glutatión reducido. En este sentido, se ha descrito que los péptidos bioactivos presentes en un hidrolizado de salvado de arroz podrían actuar activando el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2, por sus siglas en inglés: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), involucrado en la regulación de la síntesis de glutatión reducido y de un adecuado balance *redox* (Moritani et al., 2017). En estudios previos, nuestro equipo de investigación demostró la capacidad de un hidrolizado de clara de huevo para incrementar los niveles de glutatión reducido en un modelo de rata genéticamente obesa, la rata Zucker (Garcés-Rimón et al., 2016). Este aumento en los niveles de glutatión reducido en el hígado también se ha observado tras la administración de hidrolizados de proteínas procedentes de otras matrices alimentarias (Kilari et al., 2021). Asimismo, de acuerdo a la bibliografía, los péptidos antioxidantes también podrían estar involucrados en restaurar la actividad de la glutatión reductasa, enzima que permite el paso de glutatión oxidado a reducido, y que se encuentra atenuada en condiciones de estrés oxidativo (Zhang et al., 2017).

En el caso de la vitamina C, no se observaron cambios significativos de los niveles de glutatión reducido en las ratas SHR. Una dosis cuatro veces menor que la del hidrolizado de quinua roja que había mostrado incrementar de los niveles de glutatión reducido, tampoco desencadenó un efecto relevante sobre este marcador antioxidante. Por tanto, estos hallazgos ponen de manifiesto la capacidad del hidrolizado de quinua roja a una dosis de 1000 mg/kg/día para incrementar los niveles de glutatión reducido y, por tanto, de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo relacionados con la HTA.



**Figura 30.** Concentración de glutatión reducido en hígado de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Ratas SHR (color rojo): (■) control (agua destilada), (▨) vitamina C (250 mg/kg/día), (▩) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y (▧) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color gris): (■) agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C y (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los datos representan los valores medios (g) ± EEM para los 6-8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ),

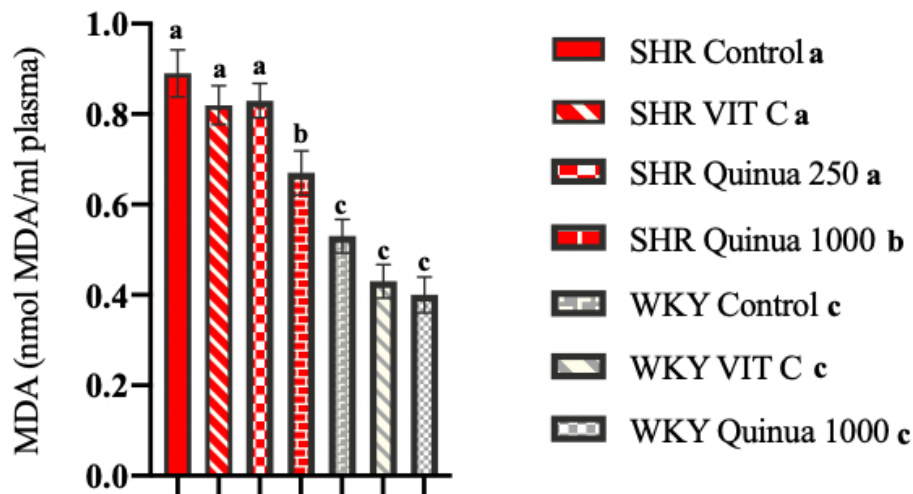
#### 4.3.4.4. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la peroxidación lipídica del plasma

Como se ha desarrollado en el apartado 1.2.1 de la introducción, las EROs pueden interaccionar con distintas biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos debido a su carácter reactivo. En este sentido, el término peroxidación lipídica hace referencia al proceso en el que los radicales libres atacan compuestos lipídicos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, dando lugar a radicales peroxilo de lípidos e hidroperóxidos (Ayala

et al., 2014). Cuando los procesos de peroxidación exceden la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante, se desencadena la apoptosis celular y el desarrollo de numerosos procesos patológicos (Bergin et al., 2021). Entre los diferentes aldehídos que pueden formarse como productos secundarios de la peroxidación lipídica encontramos el MDA, el propanal y el HNE. En concreto, el MDA es uno de los productos generados por la descomposición del ácido araquidónico y de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. El MDA no sólo se considera un biomarcador de peroxidación lipídica, sino también se ha identificado como un compuesto con potencial mutagénico (Tsikas, 2017). En sujetos con HTA se han reportado niveles elevados MDA, lo que pone de manifiesto las posibles implicaciones de la peroxidación lipídica en el origen y desarrollo de esta condición (Jeevana & Sabiullah, 2020; Leong, 2021).

Como muestra en la Figura 31, las ratas SHR que bebieron agua manifestaron unos niveles de MDA en plasma significativamente superiores respecto a su control normotenso, las ratas WKY. En el caso de las ratas WKY, la administración de vitamina C o del hidrolizado de quinua roja no ocasionó modificaciones en los niveles de MDA del plasma. Se observó sin embargo que, en las ratas SHR que consumieron la dosis más alta de hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día) disminuyeron los valores de MDA en plasma, y en consecuencia los niveles de peroxidación lipídica respecto al grupo SHR control ( $p < 0,05$ ). En cambio, la dosis baja del hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y de vitamina C (250 mg/kg/día) provocó en las ratas SHR una ligera reducción del MDA en plasma, pero no se observaron diferencias significativas respecto al grupo control. Estos hallazgos pueden explicarse, al menos en parte, por el aumento de la actividad antioxidante a nivel plasmático observado en el grupo tratado con el hidrolizado de quinua roja en una dosis de 1000 mg/kg/día que, aunque dichas diferencias no fueron significativas respecto al grupo control de ratas SHR, la tendencia observada pone de manifiesto la posibilidad de que esta vía estuviera involucrada en la inhibición de la peroxidación lipídica. Una disminución en la concentración de MDA plasmático también se evidenció en otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación, tras la administración de un hidrolizado de clara de huevo (Manso et al., 2008; Garcés-Rimón, 2014; Moreno-Fernández, Garcés-Rimón, et al., 2018). Los hidrolizados de proteínas han demostrado en modelos animales de estrés oxidativo reducir los niveles de óxido nítrico y MDA asociados al incremento de la actividad antioxidante total en plasma (Rabiei et al., 2021). Aunque los estudios realizados con hidrolizados de matrices vegetales que han evaluado este parámetro son limitados, de forma

general se observa una disminución del MDA plasmático (Senaphan et al., 2018). De acuerdo a la bibliografía, existe una correlación inversa entre la capacidad antioxidante y los niveles plasmáticos de MDA (Movahed et al., 2012; Bastani et al., 2018). En individuos con HTA se ha descrito la concurrencia de unos bajos niveles de antioxidantes plasmáticos como los  $\beta$ -carotenos, así como una concentración de MDA superior a la registrada en sujetos normotensos (Parslow et al., 2005). Del mismo modo, la ingesta de compuestos como la *Moringa Oleifera* con potencial antioxidante ha demostrado en ensayos clínicos inducir un incremento de la actividad antioxidante unido a la reducción de la peroxidación lipídica (Ngamukote et al., 2016).



**Figura 31.** Concentración de malonildialdehído (MDA) en plasma al finalizar el periodo experimental del estudio. Ratas SHR (color rojo): (■) control (agua destilada), (▨) vitamina C (250 mg/kg/día), (▩) hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día) y (▧) hidrolizado de quinua roja (1000 mg/kg/día), y de las ratas WKY (color gris): (■) agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C y (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los datos representan los valores medios (g) ± EEM para los 6-8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ )

Estos resultados indican que el grado de peroxidación lipídica es superior en animales con HTA, y que este incremento de los niveles de MDA en plasma podría verse reducido con el consumo del hidrolizado de quinua roja a una dosis de 1000 mg/kg/día.



#### 4.3.4.5. Efecto del consumo del hidrolizado de quinua roja en la peroxidación lipídica del hígado, corazón, aorta y riñón

Además de analizar la concentración de MDA a nivel plasmático, en esta Tesis Doctoral se evaluó también la peroxidación lipídica de distintos órganos diana relacionados con la fisiopatología de la HTA, ya que se podrían evidenciar cambios sustanciales de dicho parámetro tras la administración del hidrolizado de quinua roja. Como se muestra en la figura 32A, en el caso del hígado, los niveles de MDA fueron similares en el grupo control de ratas SHR y WKY que bebieron agua. En el grupo de ratas WKY, el tratamiento con vitamina C o hidrolizado de quinua roja en una dosis de 1000 mg/kg/día no ocasionó cambios en los niveles de MDA respecto al grupo control tratado con agua destilada. De forma similar, en las ratas SHR la administración de vitamina C e hidrolizado de quinua roja provocó solo una ligera reducción de la concentración del MDA hepático, sin diferencias significativas respecto a su grupo control. Aunque en estudios previos se ha descrito el potencial de los péptidos bioactivos de distintas matrices frente a la peroxidación lipídica a nivel hepático (H. W. Kim et al., 2019; Setayesh-Mehr et al., 2021), en nuestro estudio no se han podido evidenciar cambios a este nivel.

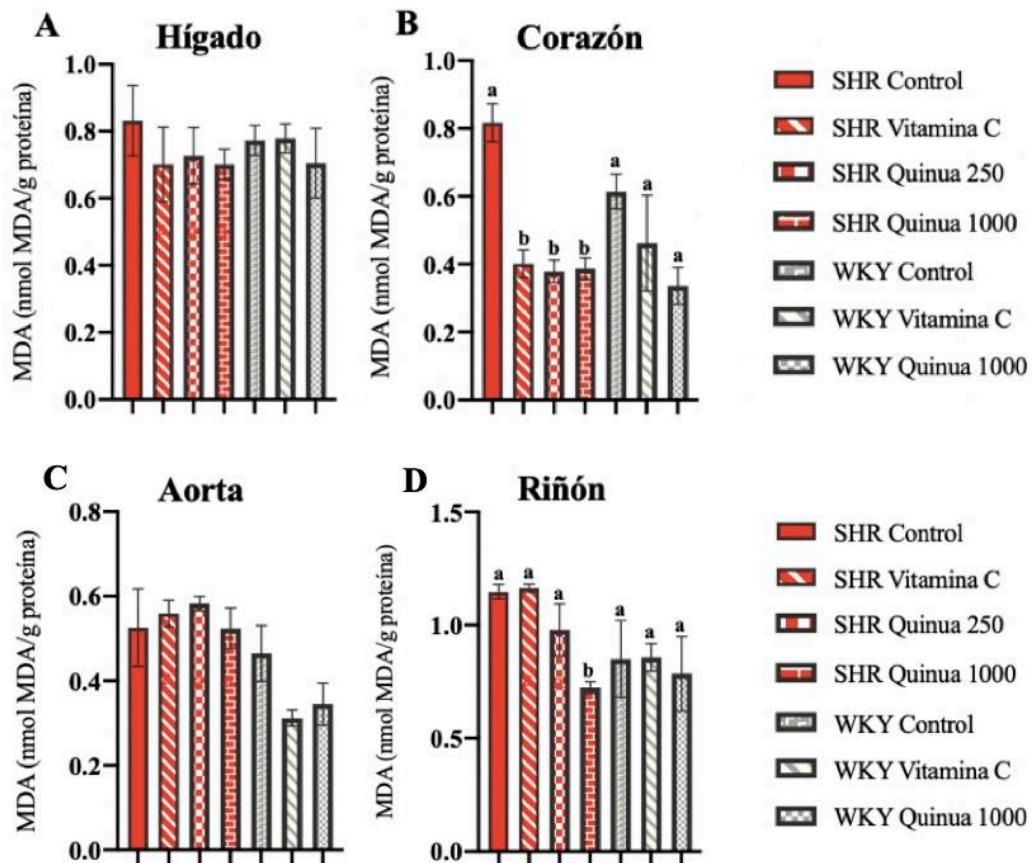
En el caso del corazón tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de MDA entre el grupo WKY y SHR control (Figura 32B). La administración de vitamina C y de 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja en las ratas WKY provocó una reducción de la concentración de MDA, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística respecto al grupo control de ratas WKY. Sin embargo, las ratas SHR tratadas con vitamina C experimentaron un descenso significativo de la peroxidación lipídica respecto al grupo SHR control ( $p < 0,05$ ). De manera similar, esta misma tendencia se observó cuando se administraron ambas dosis de hidrolizado de quinua roja (250 mg/kg/día y 1000 mg/kg/día) ( $p < 0,05$ ). De acuerdo a la bibliografía, diferentes hidrolizados de proteínas han demostrado una reducción de la peroxidación lipídica cardíaca (Yang et al., 2008). A modo de ejemplo, un hidrolizado de salvado de arroz ocasionó una reducción de los niveles de MDA en el corazón y de la oxidación proteica, además de una mejora en la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, por su siglas en inglés: *Endothelial Nitric Oxide Synthase*) y de las alteraciones cardíacas a nivel estructural (Senaphan et al., 2021). Los efectos observados en la reducción de la peroxidación lipídica en este estudio tras la administración del hidrolizados de quinua roja, podrían relacionarse con la reducción de la

presión arterial observada en este estudio si tenemos en consideración que los pacientes hipertensos suelen manifestar comúnmente un incremento de los niveles de MDA a nivel sistémico (Verma et al., 2019). Se ha postulado que algunos compuestos bioactivos presentes en matrices vegetales podrían estar involucrados en la inducción de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la catalasa, y a través de este mecanismo actuarían disminuyendo los niveles de MDA y, por tanto, el estrés oxidativo (García et al., 2021).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de MDA en la aorta de los grupos control de las ratas WKY y SHR (Figura 32C). La administración de vitamina C o del hidrolizado de quinua roja tampoco modificó los niveles de MDA en este tejido ni en el grupo de ratas WKY ni SHR en comparación a sus respectivos controles. De acuerdo a la bibliografía, un hidrolizado de clara de huevo con pepsina en la misma dosis a la empleada en nuestro estudio (1000 g/kg/día) provocó una reducción de la concentración de MDA en la aorta. Sin embargo, en dicho trabajo la determinación de la peroxidación lipídica se realizó a las 25 semanas de vida de las ratas SHR frente a las 20 semanas de nuestro estudio, lo que sugiere la necesidad de un mayor periodo de intervención (Miguel et al., 2006).

En lo que respecta a la peroxidación lipídica del riñón (Figura 32D), las ratas control SHR y WKY mostraron unos valores de MDA semejantes, y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. En las ratas WKY tratadas con vitamina C o con el hidrolizado de quinua roja en una dosis de 1000 mg/kg/día, no se observaron cambios significativos sobre la peroxidación respecto al control que bebía agua. Sin embargo, la administración del hidrolizado de quinua roja en una dosis de 1000 mg/kg/día ocasionó en las ratas SHR un descenso significativo de los niveles de MDA del riñón respecto a su grupo control, y también respecto al grupo tratado con vitamina C, y ligeramente inferior al de la dosis más baja de quinua, aunque sin llegar a mostrar en este caso diferencias significativas. Teniendo en consideración los resultados de ORAC previamente descritos, la mayor capacidad antioxidante observada en el riñón de las ratas SHR tratadas con la dosis de 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja, podría contrarrestar la formación de MDA y, de esta forma, el desarrollo de peroxidación lipídica en este órgano diana de HTA. Estos resultados están en consonancia con estudios previos que reportaron la capacidad de péptidos bioactivos de reducir la concentración de MDA en el riñón (Jahandideh et al., 2014; Jemil et al., 2017). A modo de ejemplo, un hidrolizado de vísceras de pescado mostró una reducción

de alrededor de un 6% los niveles de MDA del riñón en un modelo experimental de HTA, y además de forma similar a la reducción de los niveles de MDA observados en el caso del captopril, un fármaco antihipertensivo de amplio uso en la práctica clínica (Riyadi et al., 2020). En nuestro estudio, la disminución de los niveles de MDA del riñón en el grupo SHR tratado con la dosis alta del hidrolizado de quinua roja, alcanzó una magnitud del 37%. Sin embargo, la dosis empleada (1000 mg/kg/día) fue también superior a la descrita en el estudio citado anteriormente (300 mg/kg/día). Entre los posibles mecanismos de acción, se ha postulado que los péptidos bioactivos podrían reducir los niveles de MDA a través de la activación de enzimas involucradas en mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa (Jemil et al., 2017).



**Figura 32.** Concentración de malondialdehído (MDA) en hígado (A), corazón (B), aorta (C) y riñón (D) al finalizar el periodo experimental del estudio. Ratas SHR (color rojo): (■) control con agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día vitamina C, (▩) dosis 250 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja, (▧) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Ratas WKY, como control normotenso (color gris): (■) control con agua destilada, (▨) dosis 250 mg/kg/día de vitamina C, (▩) dosis 1000 mg/kg/día de hidrolizado de quinua roja. Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para los 8 animales de cada grupo. ANOVA de dos vías, seguido de un test post-hoc de Bonferroni. En el caso del hígado y de la aorta no existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales ( $p > 0,05$ ). En el corazón y en el riñón las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

En conjunto, los resultados obtenidos relativos a la peroxidación lipídica en el plasma y en los diferentes órganos analizados indican que el hidrolizado de quinua roja podría ejercer un papel protector a este nivel. En concreto, la reducción en los niveles de MDA se hizo evidente a nivel plasmático, cardíaco y renal, tejidos íntimamente ligados en la fisiopatología de la HTA. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los referenciados en la literatura, será necesario continuar explorando el mecanismo de acción del hidrolizado para dilucidar las vías de señalización responsables del efecto del hidrolizado de quinua roja sobre el estrés oxidativo asociado a la HTA y especialmente centrarnos en la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes y de los genes implicados en su expresión.

## 5. Conclusiones

Los resultados de esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1. De los diferentes hidrolizados llevados a cabo con las variedades de quinua blanca, roja y negra, empleando distintas enzimas de grado alimentario, aquellos obtenidos con Promod 279P, Flavorpro 373MDP, Flavorpro 750MDP y Alcalasa 2.4 LFG mostraron los perfiles sensoriales más prometedores, mientras que el resto de proteasas empleadas mostraron un perfil sensorial desagradable, principalmente relacionado con matices amargos, ácidos y astringentes que afectaron de forma negativa a la sensorialidad. El hidrolizado de quinua roja producido con Alcalasa 2.4 LFG, entre 1 y 4 horas, fue el más prometedor teniendo en cuenta los aspectos sensoriales básicos analizados, ya que presentó sabores agradables con matices dulces y olores neutros.
2. Los hidrolizados de quinua roja y negra obtenidos con las enzimas Alcalasa 2.4 LFG y Flavorpro 373MDP y a tiempos de hidrólisis inferiores a las 6 horas, mostraron los valores más elevados de actividad antioxidante *in vitro*. Este aumento de la actividad antioxidante no se relacionó con la liberación de compuestos fenólicos, que disminuyeron de forma significativa durante la hidrólisis, sino con una posible liberación de péptidos bioactivos con efecto antioxidante.
3. De los hidrolizados enzimáticos de quinua desarrollados, el que aunó una elevada actividad antioxidante *in vitro* con un óptimo perfil sensorial, fue el obtenido tras hidrolizar la quinua roja con Alcalasa 2.4 LFG durante 2 horas. Este hidrolizado se seleccionó para llevar a cabo los posteriores estudios *in vivo*.
4. El hidrolizado de quinua roja con alcalasa seleccionado demostró capacidad antioxidante *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. Se observó una capacidad de carga y un recuento de viables significativamente superior tras la administración del hidrolizado en comparación con el grupo control con agente oxidante. Esta protección antioxidante fue incluso superior a la observada con otros antioxidantes de referencia como el resveratrol o la vitamina C.

5. En el estudio realizado con ratas SHR y WKY, se observó un incremento de la ingesta líquida en los grupos que recibieron la dosis más alta de hidrolizado de quinua roja con alcalasa (1000 mg/kg/día), posiblemente relacionado con la agradable sensorialidad del producto. En cuanto al peso relativo de los distintos órganos, únicamente se encontraron diferencias significativas en el peso relativo del hígado. Las ratas SHR tratadas con hidrolizado de quinua roja con alcalasa (1000 mg/kg/día) mostraron un peso relativo del hígado inferior al de su grupo SHR control. Esto sugiere que el hidrolizado de quinua roja con alcalasa podría atenuar los cambios estructurales y/o funcionales en este tejido asociados al desarrollo de la HTA.
6. Las ratas WKY que recibieron 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa, y las ratas SHR que recibieron 250 mg/kg/día, mostraron una disminución del umbral de sensibilidad mecánica menor que la observada en sus respectivos grupos control y compatible con el desarrollo de neuropatía periférica. No se observó una disminución del umbral de sensibilidad mecánica en las ratas SHR que recibieron la dosis más alta (1000 mg/kg/día). Este resultado evidencia el potencial del hidrolizado de quinua roja con alcalasa frente al desarrollo de neuropatía periférica tanto en los estadios iniciales de la enfermedad (pre-hipertensión) como una vez instaurada la hipertensión arterial.
7. El hidrolizado de quinua roja con alcalasa desencadenó una reducción significativa de la PAS en las ratas SHR tratadas con 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa, no así con la dosis de 250 mg/kg/día, respecto a sus valores iniciales. En cambio, no se constataron diferencias significativas en la PAS entre los diferentes grupos experimentales de ratas WKY, lo que pone de manifiesto que el efecto antihipertensivo del hidrolizado de quinua roja es propio de la condición de HTA.
8. La capacidad antioxidante del riñón en el grupo de ratas SHR tras la administración de 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa incrementó de forma significativa respecto a su grupo control. No se observaron resultados relevantes en el resto de tejidos analizados. El empleo del hidrolizado de quinua roja con alcalasa podría ser de interés para potenciar los mecanismos de defensa a nivel renal frente al estrés oxidativo característico de la HTA.

9. La administración de 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa provocó un aumento significativo de los niveles de glutatión reducido en el hígado en las ratas SHR respecto a su grupo SHR control, alcanzando valores similares a los reportados en las ratas WKY control. Estos efectos no se observaron en el caso del tratamiento con 250 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa, ni tras la administración de vitamina C. Estos hallazgos ponen de manifiesto la capacidad del hidrolizado de quinua roja con alcalasa a una dosis de 1000 mg/kg/día para incrementar los mecanismos de defensa antioxidante.
  
10. Las ratas SHR tratadas con 1000 mg/kg/día del hidrolizado de quinua roja con alcalasa, mostraron una reducción significativa de los niveles de peroxidación lipídica en el plasma y en el riñón respecto a su grupo SHR control. En el caso del corazón, esta disminución en los niveles de MDA en las ratas SHR se observó con las dos dosis empleadas del hidrolizado seleccionado (250 mg/kg/día y 1000 mg/kg/día).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han demostrado el efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* del hidrolizado de quinua roja con Alcalasa 2.4 LFG y su capacidad para mejorar la HTA y sus complicaciones asociadas. En el momento actual seguimos trabajando en esta línea de investigación para profundizar en el mecanismo de acción de este hidrolizado mediante la realización de estudios histológicos, análisis de otros biomarcadores, estudios de expresión génica y expresión proteica y análisis de la microbiota intestinal. Por último, este trabajo abre la puerta a otros estudios experimentales con hidrolizados de quinua que permitan, en última instancia, que estos productos lleguen a comercializarse como ingredientes funcionales en alimentos o bebidas que mejoren las distintas patologías relacionadas con el estrés oxidativo como la HTA. Para ello, serán necesarios estudios de intervención que demuestren su eficacia y seguridad en humanos.

**Bibliografía:**

- Abegaz, T. M., Shehab, A., Gebreyohannes, E. A., Bhagavathula, A. S., & Elnour, A. A. (2017). Nonadherence to antihypertensive drugs: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 96(4), e5641. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005641>
- Adams, J. A., Uryash, A., Lopez, J. R., & Sackner, M. A. (2021). The Endothelium as a Therapeutic Target in Diabetes: A Narrative Review and Perspective. *Frontiers in Physiology*, 12, 638491. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.638491>
- Aggett, P. J., Antoine, J.-M., Asp, N.-G., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J. H., Howlett, J., Müller, D. J. G., Persin, C., Pijls, L. T. J., Reckemmer, G., Tuijelaars, S., & Verhagen, H. (2005). PASSCLAIM: consensus on criteria. *European Journal of Nutrition*, 44 Suppl 1, i5-30. <https://doi.org/10.1007/s00394-005-1104-3>
- Ahmad Nadzri, F. N., Tawalbeh, D., & Sarbon, N. M. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activity of enzymatic hydrolysed chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as influence by alcalase and papain enzyme. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102131>
- Al-Shaar, L., Satija, A., Wang, D. D., Rimm, E. B., Smith-Warner, S. A., Stampfer, M. J., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2020). Red meat intake and risk of coronary heart disease among US men: prospective cohort study. *BMJ*, 371. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4141>
- Al Khodor, S., Reichert, B., & Shatat, I. F. (2017). The Microbiome and Blood Pressure: Can Microbes Regulate Our Blood Pressure? *Frontiers in Pediatrics*, 5, 138. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00138>
- Alfonso-Izquierdo, A., Lara-González, L., Nodal-Morales, I. M., Fernández-Caraballo, D., & Heredia-Ruiz, D. (2020). Estudio de las concentraciones de glutatión reducido y malonildialdehído en pacientes con insuficiencia renal crónica asociada a hipertensión arterial. *Universidad Médica Pinareña; Vol. 16, No. 1S (2020): Suplemento MEDINTÁVILA 2018*. <http://www.revgaleno.sld.cu/index.php/ump/article/view/456>
- Alissa, E. M., & Ferns, G. A. (2017). Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1950–1962. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1040487>
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Alpsoy, Ş. (2020). *Exercise and Hypertension BT - Physical Exercise for Human Health* (J. Xiao



- (ed.); pp. 153–167). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1_10)
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup4), 240–257. <https://doi.org/10.1080/09637480902950597>
- Angeli, V., Miguel Silva, P., Crispim Massuela, D., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., Graeff-Hönninger, S., & Piatti, C. (2020). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An Overview of the Potentials of the “Golden Grain” and Socio-Economic and Environmental Aspects of Its Cultivation and Marketization. In *Foods* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/foods9020216>
- Appel, L. J., Moore, T. J., Obarzanek, E., Vollmer, W. M., Svetkey, L. P., Sacks, F. M., Bray, G. A., Vogt, T. M., Cutler, J. A., Windhauser, M. M., Lin, P. H., & Karanja, N. (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *The New England Journal of Medicine*, 336(16), 1117–1124. <https://doi.org/10.1056/NEJM199704173361601>
- Araujo, M., & Wilcox, C. S. (2014). Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(1), 74–101. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5259>
- Arima, S., Uto, H., Ibusuki, R., Kumamoto, R., Tanoue, S., Mawatari, S., Oda, K., Numata, M., Fujita, H., Oketani, M., Ido, A., & Tsubouchi, H. (2014). Hypertension exacerbates liver injury and hepatic fibrosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Int J Mol Med*, 33(1), 68–76. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1544>
- Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., Himmelfarb, C. D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J. W., Michos, E. D., Miedema, M. D., Muñoz, D., Smith, S. C. J., Virani, S. S., Williams, K. A. S., Yeboah, J., & Ziaeian, B. (2019). 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(10), e177–e232. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.03.010>
- Ashwini, A., Ramya, H. N., Ramkumar, C., Reddy, K. R., Kulkarni, R. V., Abinaya, V., Naveen, S., & Raghu, A. V. (2019). Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health: Review. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 128–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.02.019>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

- Ayepola, O. R., Cerf, M. E., Brooks, N. L., & Oguntibeju, O. O. (2014). Kolaviron, a biflavonoid complex of *Garcinia kola* seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 21(14), 1785–1793. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.09.006>
- Azadi-Yazdi, M., Karimi-Zarchi, M., Salehi-Abargouei, A., Fallahzadeh, H., & Nadjarzadeh, A. (2017). Effects of Dietary Approach to Stop Hypertension diet on androgens, antioxidant status and body composition in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomised controlled trial. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association*, 30(3), 275–283. <https://doi.org/10.1111/jhn.12433>
- Bajic, V. P., Van Neste, C., Obradovic, M., Zafirovic, S., Radak, D., Bajic, V. B., Essack, M., & Isenovic, E. R. (2019). Glutathione “Redox Homeostasis” and Its Relation to Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5028181. <https://doi.org/10.1155/2019/5028181>
- Bakker, E. N. T. P., Groma, G., Spijkers, L. J. A., de Vos, J., van Weert, A., van Veen, H., Everts, V., Arribas, S. M., & VanBavel, E. (2014). Heterogeneity in Arterial Remodeling among Sublines of Spontaneously Hypertensive Rats. *PLOS ONE*, 9(9), e107998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107998>
- Baradaran, A., Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(4), 358–367. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25097610>
- Bastani, A., Rajabi, S., Daliran, A., Saadat, H., & Karimi-Busheri, F. (2018). Oxidant and antioxidant status in coronary artery disease. *Biomed Rep*, 9(4), 327–332. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1130>
- BEDCA. (2010). *Base de Datos Española de Composición de Alimentos BEDCA*. 2010. <https://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Beltrán de Heredia, M. R. (2016). Alimentos funcionales. *Farmacia Profesional*, 30(3), 12–14. [file:///02139324/0000003000000003/v0\\_201607221221/X0213932416546681/v0\\_201607221221/es/main.assets](file:///02139324/0000003000000003/v0_201607221221/X0213932416546681/v0_201607221221/es/main.assets) ER
- Bergin, P., Leggett, A., Cardwell, C. R., Woodside, J. V., Thakkinstian, A., Maxwell, A. P., & McKay, G. J. (2021). The effects of vitamin E supplementation on malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in haemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrology*, 22(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12882-021-02328-8>

- Binda, D., Nicod, L., Viollon-Abadie, C., Rodriguez, S., Berthlot, A., Coassolo, P., & Richert, L. (2001). Strain difference (WKY, SPRD) in the hepatic antioxidant status in rat and effect of hypertension (SHR, DOCA). Ex vivo and in vitro data. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 218(1), 139–146. <https://doi.org/10.1023/A:1007268825721>
- Biswas, S. K., Faria, J. B. L. De, Biswas, S. K., & Faria, J. B. L. De. (2007). Which comes first: Renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radical Research*, 41(2), 216–224. <https://doi.org/10.1080/10715760601059672>
- Bjelakovic G, N. D. G. L. L. S. R. G., & Gluud, C. (2012). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007176.pub2>
- Bonache, M. A., Moreno-Fernández, S., Miguel, M., Sabater-Muñoz, B., & González-Muñiz, R. (2018). Small Library of Triazolyl Polyphenols Correlating Antioxidant Activity and Stability with Number and Position of Hydroxyl Groups. *ACS Combinatorial Science*, 20(12), 694–699. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.8b00118>
- Boon, C.-M., Mei Han, N., Choo, Y.-M., & Mok, S.-L. (2013). Super, Red Palm and Palm Oleins Improve the Blood Pressure, Heart Size, Aortic Media Thickness and Lipid Profile in Spontaneously Hypertensive Rats. *PloS One*, 8, e55908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055908>
- Borrajó, P., López-Pedrouso, M., Franco, D., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2020). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Porcine Liver Hydrolysates Using Flavourzyme. In *Applied Sciences* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/app10113950>
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183–S211. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114512002309>
- Brotons, C., Moral, I., Fernández, D., Cuixart, L., Muñoz, A., Soteras, A., Puig, M., Joaniquet, X., & Casasa, A. (2016). Consecuencias clínicas de la utilización de las nuevas tablas de riesgo cardiovascular SCORE OP para pacientes mayores de 65 años. *Medicina Clínica*, 147(9), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.06.035>
- Buñag, R. D. (1973). Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of Applied Physiology*, 34(2), 279–282. <https://doi.org/10.1152/jappl.1973.34.2.279>
- Câmara, J. S., Albuquerque, B. R., Aguiar, J., Corrêa, R. C. G., Gonçalves, J. L., Granato, D., Pereira, J. A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. In *Foods* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/foods10010037>

- Cámara, M., Sánchez-Mata, M. C., Fernández-Ruiz, V., Cámara, R. M., Cebadera, E., & Domínguez, L. (2021). A Review of the Role of Micronutrients and Bioactive Compounds on Immune System Supporting to Fight against the COVID-19 Disease. In *Foods* (Vol. 10, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/foods10051088>
- Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, 52(1), 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.021>
- Campbell, B. C. V, De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Canivenc-Lavier, M.-C., Neiers, F., & Briand, L. (2019). Plant polyphenols, chemoreception, taste receptors and taste management. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 22(6), 472–478. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000595>
- Cardoso, B. B., Amorim, C., Silvério, S. C., & Rodrigues, L. R. (2021). *Chapter Two - Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities* (F. B. T.-A. in F. and N. R. Toldrá (ed.); Vol. 95, pp. 41–95). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.08.001>
- Carlström, M. (2021). Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nature Reviews Nephrology*, 17(9), 575–590. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00429-z>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries (CBI). (2020). *Exporting Quinoa to Europe. The Hague, Netherlands: Netherlands Enterprise Agency, Center for the Promotion of Imports*. <https://www.cbi.eu/market-information/grains-pulses-oilseeds/quinoa-grains/market-potential>
- Ceriello, A. (2008). Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S181-4. <https://doi.org/10.2337/dc08-s245>
- Chalupa-Krebsdak, S., Long, C. J., & Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87, 84–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)

- Chareonrungrueangchai, K., Wongkawinwoot, K., Anothaisintawee, T., & Reutrakul, S. (2020). Dietary Factors and Risks of Cardiovascular Diseases: An Umbrella Review. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/nu12041088>
- Chirinos, R., Cerna, E., Pedreschi, R., Calsin, M., Aguilar-Galvez, A., & Campos, D. (2021). Multifunctional in vitro bioactive properties: Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive of protein hydrolyzates from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtained by enzymatic biotransformation. *Cereal Chemistry*, 98(2), 423–433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cche.10382>
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Velásquez-Sánchez, M., Aguilar-Galvez, A., & Campos, D. (2020). In vitro antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of enzymatically hydrolyzed quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*) proteins. *Cereal Chemistry*, 97(5), 949–957. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cche.10317>
- Choque-Quispe, D., Ligarda-Samanez, C. A., Ramos-Pacheco, B. S., Leguía Damiano, S., Calla-Florez, M., Zamalloa Puma, L. M., & Colque Condeña, L. (2021). Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Protein Content of Three Varieties of Germinated Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Ingeniería e Investigación*, 41(2 SE-), e89831. <https://doi.org/10.15446/ing.investig.v41n2.89831>
- Chugh, B., & Kamal-Eldin, A. (2020). Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 76–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.003>
- Cisneros-Yupanqui, M., Lante, A., Mihaylova, D., Krastanov, A., & Vilchez, C. (2020). Impact of consumption of cooked red and black *Chenopodium quinoa* Willd. over blood lipids, oxidative stress, and blood glucose levels in hypertension-induced rats. *Cereal Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/cche.10351>
- Conroy, R. M., Pyörälä, K., Fitzgerald, A. P., Sans, S., Menotti, A., De Backer, G., De Bacquer, D., Ducimetière, P., Jousilahti, P., Keil, U., Njølstad, I., Oganov, R. G., Thomsen, T., Tunstall-Pedoe, H., Tverdal, A., Wedel, H., Whincup, P., Wilhelmsen, L., Graham, I. M., & group, on behalf of the S. project. (2003). Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *European Heart Journal*, 24(11), 987–1003. [https://doi.org/10.1016/S0195-668X\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0195-668X(03)00114-3)
- Cooney, M. T., Selmer, R., Lindman, A., Tverdal, A., Menotti, A., Thomsen, T., DeBacker, G., De Bacquer, D., Tell, G. S., Njølstad, I., & Graham, I. M. (2016). Cardiovascular risk estimation in older persons: SCORE O.P. *European Journal of Preventive Cardiology*, 23(10), 1093–1103. <https://doi.org/10.1177/2047487315588390>
- Crozier, S. J., Preston, A. G., Hurst, J. W., Payne, M. J., Mann, J., Hainly, L., & Miller, D. L. (2011).

- Cacao seeds are a “Super Fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-5>
- Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>
- Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019a). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, 299, 125161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125161>
- Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019b). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, 299, 125161. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125161>
- Daliri, H., Ahmadi, R., Pezeshki, A., Hamishehkar, H., Mohammadi, M., Beyrami, H., Khakbaz Heshmati, M., & Ghorbani, M. (2021). Quinoa bioactive protein hydrolysate produced by pancreatin enzyme- functional and antioxidant properties. *LWT*, 150, 111853. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111853>
- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M. D., Henriques, J. A. P., & Eleutherio, E. (2008). Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 4268–4272. <https://doi.org/10.1021/jf800752s>
- Delarue, J. (2021). Mediterranean Diet and cardiovascular health: an historical perspective. *The British Journal of Nutrition*, 1–14. <https://doi.org/10.1017/S0007114521002105>
- Dhalaria, R., Verma, R., Kumar, D., Puri, S., Tapwal, A., Kumar, V., Nepovimova, E., & Kuca, K. (2020). Bioactive Compounds of Edible Fruits with Their Anti-Aging Properties: A Comprehensive Review to Prolong Human Life. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/antiox9111123>
- Diaz Valencia, Y., Alca Machaca, J., Calori-Domingues, M., Zanabria-Galvez, S., & Cruz, S. (2018). Nutritional composition, total phenolic compounds and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) of different colours. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 17, 74–85. <https://doi.org/10.2478/nbec-2018-0008>
- Ding, J., Yu, M., Jiang, J., Luo, Y., Zhang, Q., Wang, S., Yang, F., Wang, A., Wang, L., Zhuang, M., Wu, S., Zhang, Q., Xia, Y., & Lu, D. (2020). Angiotensin II Decreases Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation via AT1R Nox/ROS/PP2A Pathway. *Frontiers in Physiology*, 11, 1245. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566410>
- Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2010). Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 447–451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.010>

- Doggrell, S. A., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, 39(1), 89–105. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00076-5)
- Duarte, J., Galisteo, M., Ocete, M., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., & Tamargo, J. (2001). Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 221, 155–160. <https://doi.org/10.1023/A:1010956928584>
- E, G.-B., & Diaz Rizzolo, D. (2016). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd), from Nutritional Value to Potential Health Benefits: An Integrative Review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 06. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000497>
- El Hazzam, K., Hafsa, J., Sobeh, M., Mhada, M., Taourirte, M., El Kacimi, K., & Yasri, A. (2020). An Insight into Saponins from Quinoa (Chenopodium quinoa Willd): A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/molecules25051059>
- Elliott, P., Stamler, J., Dyer, A. R., Appel, L., Dennis, B., Kesteloot, H., Ueshima, H., Okayama, A., Chan, Q., Garside, D. B., Zhou, B., & Group, I. C. R. (2006). Association Between Protein Intake and Blood Pressure: The INTERMAP Study. *Archives of Internal Medicine*, 166(1), 79–87. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.1.79>
- Engwa, G. A., EnNwekegwa, F. N., & Nkeh-Chungag, B. N. (2020). Free Radicals, Oxidative Stress-Related Diseases and Antioxidant Supplementation. *Alternative Therapies in Health and Medicine*.
- ESC, & ESH. (2019). Guía ESC/ESH 2018 sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Española de Cardiología*, 72(2), 160.e1-160.e78. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2018.12.005>
- Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L. R., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F. (2017). Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (Chenopodium quinoa) varieties. *Food Chemistry*, 234, 285–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.187>
- Espinoza, A. L., & Martínez, H. (2001). Efectos de dos programas de privación parcial sobre el peso corporal y el consumo total de agua y comida en ratas. *Acta Comportamental*, 9(1). <http://www.revistas.unam.mx/index.php/acom/article/view/14630>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., ... Martínez-González, M. A. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *The New England Journal of Medicine*,

378(25), e34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>

Ettehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J., Chalmers, J., Rodgers, A., & Rahimi, K. (2016). Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 387(10022), 957–967. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01225-8)

Fantin, F., Giani, A., Zoico, E., Rossi, A. P., Mazzali, G., & Zamboni, M. (2019). Weight Loss and Hypertension in Obese Subjects. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nu11071667>

FAO. (2011a). *La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial*.

FAO. (2011b). *Quinoa: An Ancient Crop to Contribute to World Food Security*. Food and Agriculture Organization Regional Office for Latin America, and the Caribbean PROINPA. 2011. [http://www.fao.org/alc/file/media/pubs/2011/cultivo\\_quinoa\\_en.pdf](http://www.fao.org/alc/file/media/pubs/2011/cultivo_quinoa_en.pdf).

FAO, & WHO. (2019). Sustainable healthy diets: Guiding principles. In *Sustainable healthy diets*. Rome.

Farajzadeh, Z., Shakerian, A., Rahimi, E., & Bagheri, M. (2020). Chemical, Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Components and Antimicrobial Effects of Different Species of Quinoa Seeds. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 51(1), 43–54. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2019.17122.1098>

Fatima Zohra, M., Squeo, G., Barkat, M., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2019). *Comparative study of total phenolic content and antioxidant properties of Quercus fruit: flour and oil*. 03, 148–155. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2584087>

Filho, A. M. M., Pirozi, M. R., Borges, J. T. D. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Chaves, J. B. P., & Coimbra, J. S. D. R. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618–1630. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>

Filippa, J., Georgeta, V., Yong, L., L., D. A., & Niyati, P. (2021). Ultra-Processed Foods and Incident Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 77(12), 1520–1531. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.01.047>

Filippou, C. D., Tsioufis, C. P., Thomopoulos, C. G., Mihos, C. C., Dimitriadis, K. S., Sotiropoulou, L. I., Chrysochoou, C. A., Nihoyannopoulos, P. I., & Tousoulis, D. M. (2020). Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet and Blood Pressure Reduction in Adults with and without Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 11(5), 1150–1160. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa041>



- Frassinetti, S., Della Croce, C. M., Caltavuturo, L., & Longo, V. (2012). Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. *FOOD CHEMISTRY*, *135*(3), 2029–2034. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.090>
- Füredi, N., Miko, A., Aubrecht, B., Gaszner, B., Feller, D., Rostas, I., Tenk, J., Soos, S., Balasko, M., Maifeld, A., Pap, M., & Petervari, E. (2016). Regulatory Alterations of Energy Homeostasis in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *Journal of Molecular Neuroscience*, *59*. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0771-2>
- Gao, Y., Fang, L., Wang, X., Lan, R., Wang, M., Du, G., Guan, W., Liu, J., Brennan, M., Guo, H., Brennan, C., & Zhao, H. (2019). Antioxidant Activity Evaluation of Dietary Flavonoid Hyperoside Using *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040788>
- Gárce-Rimón, M. (2013). *Hidrolizados de proteínas de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al síndrome metabólico y sus complicaciones*.
- Garcés-Rimón, M., González, C., Uranga, J. A., López-Miranda, V., López-Fandiño, R., & Miguel, M. (2016). Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. *PLOS ONE*, *11*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151193>
- Garcés-Rimón, Marta, López-Expósito, I., López-Fandiño, R., & Miguel, M. (2015). Egg white hydrolysates with in vitro biological multiactivities to control complications associated with the metabolic syndrome. *European Food Research and Technology*, *242*. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2518-7>
- Garcés Rimón, M. (2014). *Hidrolizados de proteínas de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al síndrome metabólico y sus complicaciones*. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/660410>
- García-Sánchez, A., Miranda-Díaz, A. G., & Cardona-Muñoz, E. G. (2020). The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 2082145. <https://doi.org/10.1155/2020/2082145>
- García, C., & Blesso, C. N. (2021). Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, *172*, 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.040>
- García, J. A., Berrocoso, E., & Micó, J. A. (2021). Modelos experimentales de evaluación del dolor en artrosis. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*, *28*(13), 18 LP – 30. <https://doi.org/10.20986/resed.2021.3872/2020>

- García, J. L., Vileigas, D. F., Gregolin, C. S., Costa, M. R., Francisqueti-Ferron, F. V., Ferron, A. J. T., De Campos, D. H. S., Moreto, F., Minatel, I. O., Bazan, S. G. Z., & Corrêa, C. R. (2021). Rice (*Oryza sativa* L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02691-0>
- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, *106*, 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.041>
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *7*(5), 62. <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>
- Girgih, A. T., Alashi, A. M., He, R., Malomo, S. A., Raj, P., Netticadan, T., & Aluko, R. E. (2014). A Novel Hemp Seed Meal Protein Hydrolysate Reduces Oxidative Stress Factors in Spontaneously Hypertensive Rats. In *Nutrients* (Vol. 6, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/nu6125652>
- Gong, X., An, Q., Le, L., Geng, F., Jiang, L., Yan, J., Xiang, D., Peng, L., Zou, L., Zhao, G., & Wan, Y. (2020). Prospects of cereal protein-derived bioactive peptides: Sources, bioactivities diversity, and production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1860897>
- Görgüç, A., Gençdağ, E., & Yılmaz, F. M. (2020). Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. *Food Research International*, *136*, 109504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109504>
- Graf, B. L., Rojas-Silva, P., Rojo, L. E., Delatorre-Herrera, J., Baldeón, M. E., & Raskin, I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(4), 431–445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12135>
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, *11*, 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Graudal NA, H.-G. T., & Jurgens, G. (2020). Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *12*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004022.pub5>

- Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. *Circulation Research*, *128*(7), 993–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063>
- Guasch-Ferré, M., & Willett, W. C. (2021). The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *Journal of Internal Medicine*, *290*(3), 549–566. <https://doi.org/10.1111/joim.13333>
- Guo, H., Hao, Y., Fan, X., Richel, A., Everaert, N., Yang, X., & Ren, G. (2021). Administration with Quinoa Protein Reduces the Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats and Modifies the Fecal Microbiota. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nu13072446>
- Guo, H., Hao, Y., Richel, A., Everaert, N., Chen, Y., Liu, M., Yang, X., & Ren, G. (2020). Antihypertensive effect of quinoa protein under simulated gastrointestinal digestion and peptide characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10609>
- Guo, H., Hao, Y., Yang, X., Ren, G., & Richel, A. (2021). Exploration on bioactive properties of quinoa protein hydrolysate and peptides: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1982860>
- Hamza, S. M., & Dyck, J. R. B. (2014). Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Frontiers in Physiology*, *5*, 292. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00292>
- Han, Y., Chi, J., Zhang, M., Zhang, R., Fan, S., Huang, F., Xue, K., & Liu, L. (2019). Characterization of saponins and phenolic compounds: antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase in different varieties of colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *83*(11), 2128–2139. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1638756>
- Hayes, M., & Tiwari, B. K. (2015). Bioactive Carbohydrates and Peptides in Foods: An Overview of Sources, Downstream Processing Steps and Associated Bioactivities. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 22485–22508. <https://doi.org/10.3390/ijms160922485>
- He, F. J., Tan, M., Ma, Y., & MacGregor, G. A. (2020). Salt Reduction to Prevent Hypertension and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, *75*(6), 632–647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.11.055>
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V, Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2020). Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 14). <https://doi.org/10.3390/molecules25143152>
- Hohmann, S. (2016). Nobel Yeast Research. *FEMS Yeast Research*, *16*(8). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow094>

- Hooper, L., Martin, N., Jimoh, O. F., Kirk, C., Foster, E., & Abdelhamid, A. S. (2020). Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5(5), CD011737. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011737.pub2>
- Hosszu, A., Kaucsar, T., Seeliger, E., & Fekete, A. (2021). Animal Models of Renal Pathophysiology and Disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2216, 27–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0978-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0978-1_2)
- Howitz, K. T., & Sinclair, D. A. (2008). Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell*, 133(3), 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.019>
- Huang, J., Liao, L. M., Weinstein, S. J., Sinha, R., Graubard, B. I., & Albanes, D. (2020). Association Between Plant and Animal Protein Intake and Overall and Cause-Specific Mortality. *JAMA Internal Medicine*, 180(9), 1173–1184. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.2790>
- Huang, M.-Z., & Li, J.-Y. (2020). Physiological regulation of reactive oxygen species in organisms based on their physicochemical properties. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 228(1), e13351. <https://doi.org/10.1111/apha.13351>
- Hultström, M. (2012). Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 30(6), 1087–1091. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328352b89a>
- Ibsen, D. B., Levitan, E. B., Åkesson, A., Gigante, B., & Wolk, A. (2022). The DASH diet is associated with a lower risk of heart failure: a cohort study. *European Journal of Preventive Cardiology*, zwac003. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac003>
- Ikuta, T., Kanno, K., Arihiro, K., Matsuda, S., Kishikawa, N., Fujita, K., & Tazuma, S. (2012). Spontaneously hypertensive rats develop pronounced hepatic steatosis induced by choline-deficient diet: Evidence for hypertension as a potential enhancer in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology Research : The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 42(3), 310–320. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2011.00920.x>
- Isaskar, R., Darwanto, D. H., Waluyati, L. R., & Irham, I. (2021). The Effects of Sensory Attributes of Food on Consumer Preference. *JOURNAL OF ASIAN FINANCE ECONOMICS AND BUSINESS*, 8(3), 1303–1314. <https://doi.org/10.13106/jafeb.2021.vol8.no3.1303>
- Jacobs, D. R., & Tapsell, L. C. (2013). Food synergy: the key to a healthy diet. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 72(2), 200–206. <https://doi.org/10.1017/S0029665112003011>
- Jacobsen, S.-E. (2011). The Situation for Quinoa and Its Production in Southern Bolivia: From Economic Success to Environmental Disaster. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(5), 390–399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2011.00475.x>
- Jahandideh, F., Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S., & Wu, J. (2014). Beneficial Effects of Simulated Gastro-Intestinal Digests of Fried Egg and Its

- Fractions on Blood Pressure, Plasma Lipids and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS ONE*, 9(12): e11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115006>
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Zielińska, E., & Zieliński, D. (2020). Current Trends of Bioactive Peptides—New Sources and Therapeutic Effect. In *Foods* (Vol. 9, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/foods9070846>
- Jalili, C., Farzaei, M. H., Roshankhah, S., & Salahshoor, M. R. (2019). Resveratrol attenuates malathion-induced liver damage by reducing oxidative stress. *Journal of Laboratory Physicians*, 11, 212–219.
- Jeevana, C. J., & Sabiullah, M. (2020). A Study of Serum Paraoxonase And Malondialdehyde in Pregnancy Induced Hypertension. *International Journal of Health and Clinical Research*, 3(12), 129–138. <https://www.ijhcr.com/index.php/ijhcr/article/view/568>
- Jemil, I., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M.-C., Salem, R. B. S.-B., Kallel, C., Marrekchi, R., Jamoussi, K., ElFeki, A., Hajji, M., Toldrá, F., & Nasri, M. (2017). Beneficial effects of fermented sardinelle protein hydrolysates on hypercaloric diet induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in wistar rats. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 313–325. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2464-9>
- Jenkins, D. J. A., Spence, J. D., Giovannucci, E. L., Kim, Y., Josse, R., Vieth, R., Blanco Mejia, S., Viguiliouk, E., Nishi, S., Sahye-Pudaruth, S., Paquette, M., Patel, D., Mitchell, S., Kavanagh, M., Tsirakis, T., Bachiri, L., Maran, A., Umatheva, N., McKay, T., ... Sievenpiper, J. L. (2018). Supplemental Vitamins and Minerals for CVD Prevention and Treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(22), 2570–2584. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2018.04.020>
- Jeske, S., Zannini, E., Cronin, M. F., & Arendt, E. K. (2018). Impact of protease and amylase treatment on proteins and the product quality of a quinoa-based milk substitute. *Food & Function*, 9(6), 3500–3508. <https://doi.org/10.1039/C8FO00336J>
- Ji, C., Xu, Y., Han, F., Sun, D., Zhang, H., Li, X., Yao, X., & Wang, H. (2017). Quercetin alleviates thermal and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model by inhibiting Toll-like receptor signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 652–658. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.145>
- Jia, D., Wang, H., Han, B., Zhang, L., & Guo, J. (2019). Tempol Attenuates Neuropathic Pain by Inhibiting Nitric Oxide Production. *Analytical Cellular Pathology*, 2019, 8253850. <https://doi.org/10.1155/2019/8253850>
- Johnson, J., Wallace, T. C., Tanwar, B., Goyal, A., Irshaan, S., Kumar, V., Sihag, M. K., Patel, A., & Kaur, I. (2019). Introduction to Whole Grains and Human Health. In *Whole Grains and their*

- Bioactives* (pp. 1–17). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119129486.ch1>
- Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P. G., & Juurlink, B. H. (2000). Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry*, 286(1), 35–37. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4765>
- Kamoun, Z., Kamoun, A. S., Bougatef, A., Chtourou, Y., Boudawara, T., Nasri, M., & Zeghal, N. (2012). Efficacy of sardinelle protein hydrolysate to alleviate ethanol-induced oxidative stress in the heart of adult rats. *Journal of Food Science*, 77(8), T156-62. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02792.x>
- Kapahi, P., Kaeberlein, M., & Hansen, M. (2017). Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Research Reviews*, 39, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.12.005>
- Karami, Z., & Akbari-Adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- Karimian, J., Abedi, S., Shirinbakhshmasoleh, M., Moodi, F., Moodi, V., & Ghavami, A. (2020). The effects of quinoa seed supplementation on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Phytotherapy Research*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/ptr.6901>
- Kaur, A., Kehinde, B. A., Sharma, P., Sharma, D., & Kaur, S. (2021). Recently isolated food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides: A review. *Food Chemistry*, 346, 128719. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128719>
- Khazaei, H., Subedi, M., Nickerson, M., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Vandenberg, A. (2019). Seed Protein of Lentils: Current Status, Progress, and Food Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(9), 391. <https://doi.org/10.3390/foods8090391>
- Kilari, B. P., Mudgil, P., Azimullah, S., Bansal, N., Ojha, S., & Maqsood, S. (2021). Effect of camel milk protein hydrolysates against hyperglycemia, hyperlipidemia, and associated oxidative stress in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1304–1317. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19412>
- Kim, H. W., Shim, J. H., & Kim, K. N. (2019). Effect of Yeonsan Ogye bioactive peptides on antioxidant indexes in rats' liver. *J Nutr Health*, 52(4), 408–411. <https://doi.org/10.4163/jnh.2019.52.4.408>
- Kim, J. M., Ra, K. S., & Suh, H. J. (2004). Note. Hydrolysis of Onion and Kinetics of Non-Enzymatic Browning of its Hydrolysate. *Food Science and Technology International*, 10(1), 41–44. <https://doi.org/10.1177/1082013204041364>

- Lee, B., Jung, J.-H., & Kim, H.-S. (2012). Assessment of red onion on antioxidant activity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 3912–3919. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.004>
- Lee, B. X., Kjaerulf, F., Turner, S., Cohen, L., Donnelly, P. D., Muggah, R., Davis, R., Realini, A., Kieselbach, B., MacGregor, L. S., Waller, I., Gordon, R., Moloney-Kitts, M., Lee, G., & Gilligan, J. (2016). Transforming Our World: Implementing the 2030 Agenda Through Sustainable Development Goal Indicators. *Journal of Public Health Policy*, 37 Suppl 1, 13–31. <https://doi.org/10.1057/s41271-016-0002-7>
- Lee, H.-S., & O'Mahony, M. (2005). Sensory evaluation and marketing: Measurement of a consumer concept. *Food Quality and Preference*, 16, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.04.013>
- Lee, I.-M., Cook, N. R., Gaziano, J. M., Gordon, D., Ridker, P. M., Manson, J. E., Hennekens, C. H., & Buring, J. E. (2005). Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 294(1), 56–65. <https://doi.org/10.1001/jama.294.1.56>
- Leong, X.-F. (2021). Lipid Oxidation Products on Inflammation-Mediated Hypertension and Atherosclerosis: A Mini Review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 710. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.717740>
- Lerman, L. O., Kurtz, T. W., Touyz, R. M., Ellison, D. H., Chade, A. R., Crowley, S. D., Mattson, D. L., Mullins, J. J., Osborn, J., Eirin, A., Reckelhoff, J. F., Iadecola, C., Coffman, T. M., & null, null. (2019). Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*, 73(6), e87–e120. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>
- Li, J., Geng, X.-Y., & Cong, X.-L. (2016). PGC-1 $\alpha$  ameliorates AngiotensinII-induced eNOS dysfunction in human aortic endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 83, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.005>
- Li, K., Liu, C., Kuang, X., Deng, Q., Zhao, F., & Li, D. (2018). Effects of Multivitamin and Multimineral Supplementation on Blood Pressure: A Meta-Analysis of 12 Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/nu10081018>
- Liaqid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1), 29–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>
- Litescu, S. C., Eremia, S. A. V., Tache, A., Vasilescu, I., & Radu, G.-L. (2014). Chapter 25 - The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant

- Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties* (V. B. T.-P. and I. on A. in B. Preedy (ed.); pp. 245–251). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8>
- Liu, J., Klebach, M., Visser, M., & Hofman, Z. (2019). Amino Acid Availability of a Dairy and Vegetable Protein Blend Compared to Single Casein, Whey, Soy, and Pea Proteins: A Double-Blind, Cross-Over Trial. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/nu11112613>
- Liu, M., Zhu, K., Yao, Y., Chen, Y., Guo, H., Ren, G., Yang, X., & Li, J. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities of phenolic compounds from white, red and black Chenopodium quinoa seed. *Cereal Chemistry*, *97*. <https://doi.org/10.1002/cche.10286>
- Liu, X., Jiang, D., & Peterson, D. G. (2014). Identification of Bitter Peptides in Whey Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(25), 5719–5725. <https://doi.org/10.1021/jf4019728>
- Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Panić, M., Slivac, I., & Gaurina Srček, V. (2020). Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods for Human Nutrition*, *75*(4), 518–524. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00841-z>
- López-Barrios, L., Antunes-Ricardo, M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016). Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*, *203*, 417–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.048>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chemistry*, *193*, 256–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Luo, D., Xu, J., Chen, X., Zhu, X., Liu, S., Li, J., Xu, X., Ma, X., Zhao, J., & Ji, X. (2020). (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates salt-induced hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Scientific Reports*, *10*(1), 4783. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61794-6>
- MacFie, H., Meiselman, H. L., Tuorila, H., Rozin, P., Yeomans, M. R., Saba, A., Siegrist, M., Buck, D., Krystallis, A., Brunsø, K., Grunert, K. G., Cardello, A. V., Köster, E. P., Mojet, J., Thomson, D., Stone, H., Sidel, J. L., van Kleef, E., van Trijp, H. C. M., ... MacFie, H. (2007). Contributor contact details. In H. B. T.-C.-L. F. P. D. MacFie (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. xiii–xvi). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-072-4.50026-2>
- Machado, M. D., & Soares, E. V. (2012). Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *Journal of Applied Phycology*, *24*,



- 1509–1516.
- Mahdavi-Yekta, M., Nouri, L., & Azizi, M. H. (2019). The effects of hydrolysis condition on antioxidant activity of protein hydrolyzate from *quinoa*. *Food Science & Nutrition*, 7(3), 930–936. <https://doi.org/10.1002/fsn3.871>
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2015). Modifying the Cold Gelation Properties of Quinoa Protein Isolate: Influence of Heat-Denaturation pH in the Alkaline Range. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 250–256. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0487-4>
- Manso, M. A., Miguel, M., Even, J., Hernández, R., Aleixandre, A., & López-Fandiño, R. (2008). Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 109(2), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.049>
- Mariod, A. A., & Salama, S. M. (2020). The Efficacy of Processing Strategies on the Gastroprotective Potentiality of *Chenopodium quinoa* Seeds. *The Scientific World Journal*, 2020, 6326452. <https://doi.org/10.1155/2020/6326452>
- Martínez-González, M. A., Sánchez-Tainta, A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ros, E., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Lamuela-Raventós, R. M., Schröder, H., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Pinto, X., Ruiz-Gutierrez, V., & for the PREDIMED Group, R. E. (2014). A provegetarian food pattern and reduction in total mortality in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(suppl\_1), 320S-328S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071431>
- Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 137, 111178. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111178>
- Martinez, C. S., Vera, G., Ocio, J. A. U., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Miguel, M., & Wiggers, G. A. (2018). Aluminum exposure for 60days at an equivalent human dietary level promotes peripheral dysfunction in rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 181, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.011>
- Martono, Y., Yanuarsih, F. F., Aminu, N. R., & Muninggar, J. (2019). Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound {from *Moringa*} oleifera leaves. 1307, 12014. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1307/1/012014>
- Martorell, P., Forment, J., Llanos, R., Montón, F., Llopis, S., González, N., Genovés Martínez, S., Cienfuegos, E., Monzó, H., & Ramón, D. (2011). Use of *Saccharomyces cerevisiae* and

- Caenorhabditis elegans as Model Organisms To Study the Effect of Cocoa Polyphenols in the Resistance to Oxidative Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2077–2085. <https://doi.org/10.1021/jf104217g>
- Masaebi, F., Salehi, M., Kazemi, M., Vahabi, N., Azizmohammad Looha, M., & Zayeri, F. (2021). Trend analysis of disability adjusted life years due to cardiovascular diseases: results from the global burden of disease study 2019. *BMC Public Health*, 21(1), 1268. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-11348-w>
- Massaretto, I. L., Madureira Alves, M. F., Mussi de Mira, N. V., Carmona, A. K., & Lanfer Marquez, U. M. (2011). Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Cereal Science*, 54(2), 236–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.06.006>
- Mathai, J. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2017). Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition*, 117(4), 490–499. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114517000125>
- Matijasevic Mostajo, J. (2014). EL CÍRCULO VICIOSO DE LOS EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN POBLACIONES RURALES MIGRANTES DEL ALTIPLANO BOLIVIANO . In *Luna Azul* (pp. 11–29). scieloco .
- Matuo, R., Sousa, F. G., Soares, D. G., Bonatto, D., Saffi, J., Escargueil, A. E., Larsen, A. K., & Henriques, J. A. P. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(4), 491–502. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-1937-4>
- Mazzocchi, A., De Cosmi, V., Risé, P., Milani, G. P., Turolo, S., Syrén, M.-L., Sala, A., & Agostoni, C. (2021). Bioactive Compounds in Edible Oils and Their Role in Oxidative Stress and Inflammation . In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12, p. 598). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.659551>
- Medina, I., Alcantara, D., Gonzalez, M., Salas, P., Lucas Rodriguez, R., Roque, J., Plou, F., & Morales, J. (2010). Antioxidant Activity of Resveratrol in Several Fish Lipid Matrices: Effect of Acylation and Glucosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9778–9786. <https://doi.org/10.1021/jf101472n>
- Melini, V., & Melini, F. (2021). Functional Components and Anti-Nutritional Factors in Gluten-Free Grains: A Focus on Quinoa Seeds. In *Foods* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/foods10020351>

- Mendoza, M. F., Kachur, S. M., & Lavie, C. J. (2020). Hypertension in obesity. *Current Opinion in Cardiology*, 35(4). [https://journals.lww.com/co-cardiology/Fulltext/2020/07000/Hypertension\\_in\\_obesity.14.aspx](https://journals.lww.com/co-cardiology/Fulltext/2020/07000/Hypertension_in_obesity.14.aspx)
- Meng, D., Zhang, P., Li, S. M., Ho, C. T., & Zhao, H. (2017). Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS*, 38, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.041>
- Meng, S., Cui, Z., Li, M., Li, T., Wu, F., Kang, T., & Meng, H. (2021). Associations between Dietary Animal and Plant Protein Intake and Cardiometabolic Risk Factors-A Cross-Sectional Study in China Health and Nutrition Survey. *Nutrients*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/nu13020336>
- Mhada, M., Metougui, M. L., El Hazzam, K., El Kacimi, K., & Yasri, A. (2020). Variations of Saponins, Minerals and Total Phenolic Compounds Due to Processing and Cooking of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds. In *Foods* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/foods9050660>
- Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1914–1920. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1914>
- Miguel, Marta, López-Fandiño, R., Ramos, M., & Aleixandre, A. (2005). Short-Term Effect of Egg-White Hydrolysate Products on the Arterial Blood Pressure of Hypertensive Rats. *The British Journal of Nutrition*, 94, 731–737. <https://doi.org/10.1079/BJN20051570>
- Miguel, Marta, López-Fandiño, R., Ramos, M., & Aleixandre, A. (2006). Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 78, 2960–2966. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.025>
- Miller, V., Micha, R., Choi, E., Karageorgou, D., Webb, P., & Mozaffarian, D. (2022). Evaluation of the Quality of Evidence of the Association of Foods and Nutrients With Cardiovascular Disease and Diabetes: A Systematic Review. *JAMA Network Open*, 5(2), e2146705–e2146705. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.46705>
- Mine, Y., Miyashita, K., & Shahidi, F. (2009). *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease: Food Factors and Gene Interactions*. <https://doi.org/10.1002/9780813807263>
- Monteiro, C. A., Cannon, G., Levy, R. B., Moubarac, J.-C., Louzada, M. L., Rauber, F., Khandpur, N., Cediel, G., Neri, D., Martinez-Steele, E., Baraldi, L. G., & Jaime, P. C. (2019). Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutrition*, 22(5), 936–941. <https://doi.org/10.1017/S1368980018003762>
- Morales, D., Miguel, M., & Garcés-Rimón, M. (2020). Pseudocereals: a novel source of biologically

- active peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761774>
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., Vera, G., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/nu10101502>
- Moreno-Fernández, S., Rimón, M. G., Uranga-Ocio, J. A., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). *Egg white hydrolysate reduces oxidative stress and adiposity in high-fat/high-glucose diet induced obesity rats*.
- Moritani, C., Kawakami, K., Fujita, A., Kawakami, K., Hatanaka, T., & Tsuboi, S. (2017). Antioxidative Activity of Hydrolysate from Rice Bran Protein in HepG2 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(7), 984–991. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00971>
- Movahed, A., Iranpour, D., Nabipour, I., Jafari, M., Akbarzadeh, S., Assadi, M., Mirzaei, K., & Hagian, N. (2012). Plasma malondialdehyde, bilirubin, homocysteine and total antioxidant capacity in patients with angiographically defined coronary artery disease. *African Journal of Biotechnology*, 11, 3187–3191. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3236>
- Mozaffarian, D., Micha, R., & Wallace, S. (2010). Effects on Coronary Heart Disease of Increasing Polyunsaturated Fat in Place of Saturated Fat: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLOS Medicine*, 7(3), e1000252. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000252>
- Mudgil, P., Kilari, B. P., Kamal, H., Olalere, O. A., FitzGerald, R. J., Gan, C.-Y., & Maqsood, S. (2020). Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes. *Journal of Cereal Science*, 96, 103130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103130>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Murray, C. J., & Acharya, A. K. (1997). Understanding DALYs (disability-adjusted life years). *Journal of Health Economics*, 16(6), 703–730. [https://doi.org/10.1016/s0167-6296\(97\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0167-6296(97)00004-0)
- Naik, A. K., Tandan, S. K., Kumar, D., & Dudhgaonkar, S. P. (2006). Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *European Journal of*

- Pharmacology*, 530(1), 59–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.029>
- Najjar, R. S., Moore, C. E., & Montgomery, B. D. (2018). A defined, plant-based diet utilized in an outpatient cardiovascular clinic effectively treats hypercholesterolemia and hypertension and reduces medications. *Clinical Cardiology*, 41(3), 307–313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/clc.22863>
- National Guideline Centre. (2019). *Hypertension in adults: diagnosis and management*.
- NCD Countdown 2030 Collaborators. (2018). NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. In *Lancet (London, England)* (Vol. 392, Issue 10152). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31992-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31992-5)
- Nestel, P. J., Beilin, L. J., Clifton, P. M., Watts, G. F., & Mori, T. A. (2021). Practical Guidance for Food Consumption to Prevent Cardiovascular Disease. *Heart, Lung and Circulation*, 30(2), 163–179. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2020.08.022>
- Ng, C. Y., & Wang, M. (2021). The functional ingredients of quinoa (*Chenopodium quinoa*) and physiological effects of consuming quinoa: A review. *Food Frontiers*, n/a(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fft2.109>
- Ngamukote, S., Khannongpho, T., Siriwatanapaiboon, M., Sirikwanpong, S., Dahlan, W., & Adisakwattana, S. (2016). Moringa Oleifera leaf extract increases plasma antioxidant status associated with reduced plasma malondialdehyde concentration without hypoglycemia in fasting healthy volunteers. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11655-016-2515-0>
- Nickel, J., Spanier, L. P., Botelho, F. T., Gularte, M. A., & Helbig, E. (2016). Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains. *Food Chemistry*, 209, 139–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.031>
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, 14(9), e1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
- Niro, S., D'Agostino, A., Fratianni, A., Cinquanta, L., & Panfili, G. (2019). Gluten-Free Alternative Grains: Nutritional Evaluation and Bioactive Compounds. *Foods*, 8(6), 208. <https://doi.org/10.3390/foods8060208>
- Nissensohn, M., Román-Viñas, B., Sánchez-Villegas, A., Piscopo, S., & Serra-Majem, L. (2016). The Effect of the Mediterranean Diet on Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 48(1), 42-53.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jneb.2015.08.023>

- Ntie-Kang, F. (2019). Mechanistic role of plant-based bitter principles and bitterness prediction for natural product studies II: prediction tools and case studies. *Physical Sciences Reviews*, 4(8). <https://doi.org/doi:10.1515/psr-2019-0007>
- Nyo, M. K., & Nguyen, L. T. (2019). Value-Addition of Defatted Peanut Cake by Proteolysis: Effects of Proteases and Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Capacity of Peptides. *Waste and Biomass Valorization*, 10(5), 1251–1259. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0146-0>
- O'Donnell, M. J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M. J., Mondo, C., Damasceno, A., Lopez-Jaramillo, P., Hankey, G. J., Dans, A. L., Yusoff, K., Truelsen, T., Diener, H.-C., Sacco, R. L., ... Yusuf, S. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet (London, England)*, 376(9735), 112–123. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60834-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3)
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.169>
- Ojha, U., Ruddaraju, S., Sabapathy, N., Ravindran, V., Worapongsatitaya, P., Haq, J., Mohammed, R., & Patel, V. (2021). Current and Emerging Classes of Pharmacological Agents for the Management of Hypertension. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40256-021-00510-9>
- Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27, 282–293. <https://doi.org/10.1253/jcj.27.282>
- Olagnero, G., Genevois, C., Irei, A. V., Josefina, M., & Silvia, B. (2007). Alimentos funcionales: Conceptos, Definiciones y Marco Legal. *DIAETA*, 25, 31.
- Olson, B. J. S. C., & Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 3, Unit 3.4. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifková, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., & Whelton, P. K. (2018). Hypertension. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, 18014. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>
- OY Growth Curves Ab Ltd. (2017). *User's manual Bioscreen c.: Vol. Bioscreen*. [http://www.bioscreen.fi/images/Bioscreen User Manual 2016.pdf](http://www.bioscreen.fi/images/Bioscreen%20User%20Manual%202016.pdf)
- Pan, M., Liu, K., Yang, J., Liu, S., Wang, S., & Wang, S. (2020). Advances on Food-Derived Peptidic Antioxidants—A Review. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/antiox9090799>

- Parslow, R. A., Sachdev, P., Salonikas, C., Lux, O., Jorm, A. F., & Naidoo, D. (2005). Associations between plasma antioxidants and hypertension in a community-based sample of 415 Australians aged 60–64. *Journal of Human Hypertension*, *19*(3), 219–226. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001809>
- Paula, T. P., Viana, L. V., Neto, A. T. Z., Leitão, C. B., Gross, J. L., & Azevedo, M. J. (2015). Effects of the DASH Diet and Walking on Blood Pressure in Patients With Type 2 Diabetes and Uncontrolled Hypertension: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, *17*(11), 895–901. <https://doi.org/10.1111/jch.12597>
- Pavadhgul, P., Bumrungpert, A., Harjani, Y., & Kurilich, A. (2019). Oat porridge consumption alleviates markers of inflammation and oxidative stress in hypercholesterolemic adults. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *28*, 260–265. [https://doi.org/10.6133/apjcn.201906\\_28\(2\).0008](https://doi.org/10.6133/apjcn.201906_28(2).0008)
- Peighambaroust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/biom11050631>
- Peláez-Soto, A., Roig, P., Martínez-Culebras, P. V., Fernández-Espinar, M. T., & Gil, J. V. (2020). Proteomic Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Response to Oxidative Stress Mediated by Cocoa Polyphenols Extract. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030452>
- Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Bioactive Peptides and Dietary Polyphenols: Two Sides of the Same Coin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(15), 3443. <https://doi.org/10.3390/molecules25153443>
- Pérez de Vega, M. J., Moreno-Fernández, S., Pontes-Quero, G. M., González-Amor, M., Vázquez-Lasa, B., Sabater-Muñoz, B., Briones, A. M., Aguilar, M. R., Miguel, M., & González-Muñiz, R. (2020). Characterization of Novel Synthetic Polyphenols: Validation of Antioxidant and Vasculoprotective Activities. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(9), 787. <https://doi.org/10.3390/antiox9090787>
- Perrone, A., Giovino, A., Benny, J., & Martinelli, F. (2020). Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 3818196. <https://doi.org/10.1155/2020/3818196>
- Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, *100*(2), 201–220. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90222-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90222-7)
- Pineli, L. de L. de O., Botelho, R. B. A., Zandonadi, R. P., Solorzano, J. L., de Oliveira, G. T., Reis,

- C. E. G., & Teixeira, D. da S. (2015). Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1261–1267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.094>
- Piñuel, L., Boeri, P., Zubillaga, F., Barrio, D. A., Torreta, J., Cruz, A., Vásquez, G., Pinto, A., & Carrillo, W. (2019). Production of White, Red and Black Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd Var. Real) Protein Isolates and Its Hydrolysates in Germinated and Non-Germinated Quinoa Samples and Antioxidant Activity Evaluation. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 257. <https://doi.org/10.3390/plants8080257>
- Piotrowicz, I. B. B., Garcés-Rimón, M., Moreno-Fernández, S., Aleixandre, A., Salas-Mellado, M., & Miguel-Castro, M. (2020). Antioxidant, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Properties and Blood-Pressure-Lowering Effect of Rice Bran Protein Hydrolysates. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(6), 812. <https://doi.org/10.3390/foods9060812>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
- Poljsak, B., & Milisav, I. (2012). The neglected significance of “antioxidative stress”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 480895. <https://doi.org/10.1155/2012/480895>
- Quelal, M., Karina Nazate, Villacrés, E., & Cuaran, J. (2019). *Obtención y caracterización de un hidrolizado proteico de quinua Chenopodium quinoa Willd.* 10, 79–89. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v10n2.424>
- Rabiei, S., Rezaei, M., Nikoo, M., Khezri, M., Rafieian-Kopai, M., & Anjomshoaa, M. (2021). Antioxidant properties of Klunzinger’s mullet (*Liza klunzingeri*) protein hydrolysates prepared with enzymatic hydrolysis using a commercial protease and microbial hydrolysis with *Bacillus licheniformis*. *Food Science and Technology International = Ciencia y Tecnología de Los Alimentos Internacional*, 10820132211005296. <https://doi.org/10.1177/10820132211005297>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasaiah, U., Gopas, J., & Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Raji, I., Obikeze, K., & Mugabo, P. (2016). Comparison of the acute effects of *Tulbaghia violacea* William Henry Harvey (Alliaceae) on blood pressure and heart rate of ageing male normotensive Wistar kyoto rats and adult male spontaneously hypertensive rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 2429–2434. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i11.18>



- Ramírez-Torres, G., Ontiveros, N., Lopez-Teros, V., Ibarra-Diarte, J. A., Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E. O., & Cabrera-Chávez, F. (2017). Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111905>
- Reckelhoff, J. F., Yanes Cardozo, L. L., & Fortepiani, M. L. A. (2018). *Chapter 52 - Models of Hypertension in Aging* (J. L. Ram & P. M. B. T.-C. H. of M. for H. A. (Second E. Conn (eds.); pp. 703–720). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811353-0.00052-X>
- Rimoldi, S. F., Scherrer, U., & Messerli, F. H. (2014). Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *European Heart Journal*, *35*(19), 1245–1254. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh534>
- Riyadi, P. H., Atho'illah, M. F., Tanod, W. A., & Rahmawati, I. S. (2020). Tilapia viscera hydrolysate extract alleviates oxidative stress and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension rats. *Veterinary World*, *13*(11), 2477–2483. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2477-2483>
- Rizzetti, D. A., Fernandez, F., Moreno, S., Uranga Ocio, J. A., Peçanha, F. M., Vera, G., Vassallo, D. V., Castro, M. M., & Wiggers, G. A. (2016). Egg white hydrolysate promotes neuroprotection for neuropathic disorders induced by chronic exposure to low concentrations of mercury. *Brain Research*, *1646*, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.037>
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, *104*(S2), S1–S63. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0007114510003363>
- Rocchetti, G., Lucini, L., Rodriguez, J. M. L., Barba, F. J., & Giuberti, G. (2019). Gluten-free flours from cereals, pseudocereals and legumes: Phenolic fingerprints and in vitro antioxidant properties. *Food Chemistry*, *271*, 157–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.176>
- Rodriguez-Martinez, M. A., & Ruiz-Torres, A. (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, *66*(2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(92\)90137-3](https://doi.org/10.1016/0047-6374(92)90137-3)
- Romulo, A. (2020). The Principle of Some In vitro Antioxidant Activity Methods: Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *426*, 12177. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/426/1/012177>

- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., ... Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, *76*(25), 2982–3021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Ruiz-Hernandez, A., Tellez-Plaza, M., Dominguez-Lucas, A., Pichler, G., Martin-Escudero, J. C., Martinez-Garcia, F., Vela-Bernal, S., & Redon, J. (2018). Population attributable risk for cardiovascular disease associated with hypertension. Results from the hortega follow-up study. *Journal of Hypertension*, *36*. [https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2018/06001/POPULATION\\_ATTRIBUTABLE\\_RISK\\_FOR\\_CARDIOVASCULAR.73.aspx](https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2018/06001/POPULATION_ATTRIBUTABLE_RISK_FOR_CARDIOVASCULAR.73.aspx)
- Ruiz, K. B., Biondi, S., Oses, R., Acuña-Rodríguez, I. S., Antognoni, F., Martínez-Mosqueira, E. A., Coulibaly, A., Canahua-Murillo, A., Pinto, M., Zurita-Silva, A., Bazile, D., Jacobsen, S.-E., & Molina-Montenegro, M. A. (2014). Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *34*(2), 349–359. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0195-0>
- Saco-Ledo, G., Valenzuela, P. L., Ruiz-Hurtado, G., Ruilope, L. M., & Lucia, A. (2020). Exercise Reduces Ambulatory Blood Pressure in Patients With Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of the American Heart Association*, *9*(24), e018487. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018487>
- Saffi, J., Sonogo, L., Varela, Q. D., & Salvador, M. (2006). Antioxidant activity of L-ascorbic acid in wild-type and superoxide dismutase deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *REDOX REPORT*, *11*(4), 179–184. <https://doi.org/10.1179/135100006X116691>
- Saha, B., & Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, *19*, 355–370. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00070-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00070-2)
- Şahin, B., & İlğün, G. (2020). Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health & Social Care in the Community*, *n/a*(*n/a*). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/hsc.13156>
- Samtiya, M., Aluko, R. E., Dhewa, T., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: An Overview. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(4), 839. <https://doi.org/10.3390/foods10040839>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, *1*(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>

- Saulle, R., & La Torre, G. (2010). The Mediterranean Diet, recognized by UNESCO as a cultural heritage of humanity. *Italian Journal of Public Health*, 7, 414–415. <https://doi.org/10.2427/5700>
- Schlick Moffettfield, C., & Bubenheim, D. (1996). *Quinoa: candidate crop for NASA's controlled ecological life support systems*. ASHS Press.
- Semlitsch, T., Jeitler, K., Berghold, A., Horvath, K., Posch, N., Poggenburg, S., & Siebenhofer, A. (2016). Long-term effects of weight-reducing diets in people with hypertension. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3(3), CD008274. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008274.pub3>
- Senaphan, K., Kukongviriyapan, U., Suwannachot, P., Thiratanaboon, G., Sangartit, W., Thawornchinsombut, S., & Jongjareonrak, A. (2021). Protective effects of rice bran hydrolysates on heart rate variability, cardiac oxidative stress, and cardiac remodeling in high fat and high fructose diet-fed rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 11, 183. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.311754>
- Senaphan, K., Sangartit, W., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V., Pannangpetch, P., Thawornchinsombut, S., Greenwald, S. E., & Kukongviriyapan, U. (2018). Rice bran protein hydrolysates reduce arterial stiffening, vascular remodeling and oxidative stress in rats fed a high-carbohydrate and high-fat diet. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 219–230. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1311-0>
- Setayesh-Mehr, Z., Ghasemi, L. V., & Asoodeh, A. (2021). Evaluation of the in vivo antihypertensive effect and antioxidant activity of HL-7 and HL-10 peptide in mice. *Molecular Biology Reports*, 48(7), 5571–5578. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06576-7>
- Shahid, M., Subhan, F., Islam, N. U., Ahmad, N., Farooq, U., Abbas, S., Akbar, S., Ullah, I., Raziq, N., & Din, Z. U. (2021). The antioxidant N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (tiopronin) attenuates expression of neuropathic allodynia and hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(4), 603–617. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01995-y>
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., Zielińska, D., Kołożyn-Krajewska, D., Salehi, B., Milton Prabu, S., Schutz, F., Docea, A. O., Martins, N., & Calina, D. (2020). Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(9), 433. <https://doi.org/10.3390/medicina56090433>
- Shi, Z., Hao, Y., Teng, C., Yao, Y., & Ren, G. (2019). Functional properties and adipogenesis inhibitory activity of protein hydrolysates from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Science & Nutrition*, 7(6), 2103–2112. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1052>

- Silva, A. R. A., Silva, M. M. N., & Ribeiro, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, *131*, 108972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
- Silveira Coelho, M., de Araujo Aquino, S., Machado Latorres, J., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. *Food Hydrocolloids*, *91*, 19–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.018>
- Singh, K. V., & Singh, R. (2016). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd), functional superfood for today's world: A Review*.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Oxidants and Antioxidants Part A* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sneddon, L. U., Halsey, L. G., & Bury, N. R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *The Journal of Experimental Biology*, *220*(Pt 17), 3007–3016. <https://doi.org/10.1242/jeb.147058>
- Sobota, A., Świeca, M., Gęsiński, K., Wirkijowska, A., & Bochnak, J. (2020). Yellow-coated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) – physicochemical, nutritional, and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(5), 2035–2042. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.10222>
- Sodeifian, G., & Sajadian, S. A. (2021). Antioxidant capacity, physicochemical properties, thermal behavior, and oxidative stability of nectarine (*Prunus persica* var. *nucipersica*) kernel oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(2), e15198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.15198>
- Sousa, N., Mendes, R., Abrantes, C., Sampaio, J., & Oliveira, J. (2013). A randomized 9-month study of blood pressure and body fat responses to aerobic training versus combined aerobic and resistance training in older men. *Experimental Gerontology*, *48*(8), 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.04.008>
- Souza, Laurent, Horta, I., Rosa, L., Lima, L., Rosa, J., Montenegro, J., Santos, L., Castro, R., Freitas-Silva, O., & Teodoro, A. (2020). Effect of the roasting levels of *Coffea arabica* L. extracts on their potential antioxidant capacity and antiproliferative activity in human prostate cancer cells. *RSC Advances*, *10*, 30115–30126. <https://doi.org/10.1039/D0RA01179G>
- Souza, LDZD, da Fonseca, S., Ferrari, A., & Felipe, D. F. (2021). beta-ecdysone content and antioxidant capacity in different organs of Brazilian ginseng. *CIENCIA RURAL*, *51*(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478er20200618>

- Spehar, C. (2006). Adaptation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to increase the agricultural and alimentary diversity in Brazil. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 23, 41–62.
- Spence, C. (2015). Multisensory Flavor Perception. *Cell*, 161(1), 24–35. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.03.007>
- Sprouffske, K., & Wagner, A. (2016). Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*, 17, 172. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>
- Srour, B., Fezeu, L. K., Kesse-Guyot, E., Allès, B., Méjean, C., Andrianasolo, R. M., Chazelas, E., Deschasaux, M., Hercberg, S., Galan, P., Monteiro, C. A., Julia, C., & Touvier, M. (2019). Ultra-processed food intake and risk of cardiovascular disease: prospective cohort study (NutriNet-Santé). *BMJ*, 365, 11451. <https://doi.org/10.1136/bmj.11451>
- Starowicz, M., & Zieliński, H. (2019). How Maillard Reaction Influences Sensorial Properties (Color, Flavor and Texture) of Food Products? *Food Reviews International*, 35(8), 707–725. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600538>
- Tain, Y.-L., Hsu, C.-N., & Lu, P.-C. (2017). Early short-term treatment with exogenous hydrogen sulfide postpones the transition from prehypertension to hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, 40, 1–7. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1313847>
- Takagi, H., & Kitagaki, H. (2015). *Stress Biology of Yeasts and Fungi*. Springer Japan.
- Tang, C., Wang, X., Qin, L.-Q., & Dong, J.-Y. (2021). Mediterranean Diet and Mortality in People with Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/nu13082623>
- Taylor, B. K., Roderick, R. E., St. Lezin, E., & Basbaum, A. I. (2001). Hypoalgesia and hyperalgesia with inherited hypertension in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(2), R345–R354. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.2.R345>
- Tejero, J., Shiva, S., & Gladwin, M. T. (2019). Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiological Reviews*, 99(1), 311–379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
- Teng, C., Shi, Z., Yao, Y., & Ren, G. (2020). Structural Characterization of Quinoa Polysaccharide and Its Inhibitory Effects on 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101511>
- Tharrey, M., Mariotti, F., Mashchak, A., Barbillon, P., Delattre, M., & Fraser, G. E. (2018). Patterns of plant and animal protein intake are strongly associated with cardiovascular mortality: the

- Adventist Health Study-2 cohort. *International Journal of Epidemiology*, 47(5), 1603–1612. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy030>
- Toh, D. W. K., Koh, E. S., & Kim, J. E. (2020). Incorporating healthy dietary changes in addition to an increase in fruit and vegetable intake further improves the status of cardiovascular disease risk factors: A systematic review, meta-regression, and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition Reviews*, 78(7), 532–545. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz104>
- Tordoff, M. G., Alarcon, L. K., & Lawler, M. P. (2008). Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. *Physiology & Behavior*, 95(3), 308–332. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.06.010>
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 659–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>
- Trippodo, N. C., & Frohlich, E. D. (1981). Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circulation Research*, 48(3), 309–319. <https://doi.org/10.1161/01.res.48.3.309>
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N. A., Poulter, N. R., Prabhakaran, D., Ramirez, A., Schlaich, M., Stergiou, G. S., Tomaszewski, M., Wainford, R. D., Williams, B., & Schutte, A. E. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, 75(6), 1334–1357. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026>
- United Nations General Assembly. (2015). *Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development*. [http://www.un.org/ga/search/view\\_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E](http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E)
- USDA. (2010). *USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC of Selected Foods, Release 2.0)*.
- Vaikma, H., Kaleda, A., Rosend, J., & Rosenvald, S. (2021). Market mapping of plant-based milk alternatives by using sensory (RATA) and GC analysis. *Future Foods*, 4, 100049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100049>
- Vairetti, M., Di Pasqua, L. G., Cagna, M., Richelmi, P., Ferrigno, A., & Berardo, C. (2021). Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(3), 364. <https://doi.org/10.3390/antiox10030364>
- Varagic, J., Ahmad, S., Brosnihan, K. B., Habibi, J., Tilmon, R. D., Sowers, J. R., & Ferrario, C. M.

- (2010). Salt-Induced Renal Injury in Spontaneously Hypertensive Rats: Effects of Nebivolol. *American Journal of Nephrology*, 32(6), 557–566. <https://doi.org/10.1159/000321471>
- Vázquez, L., Corzo-Martínez, M., Arranz-Martínez, P., Barroso, E., Reglero, G., & Torres, C. (2019). *Bioactive Lipids BT - Bioactive Molecules in Food* (J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (eds.); pp. 467–527). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6\\_58](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_58)
- Verma, M. K., Jaiswal, A., Sharma, P., Kumar, P., & Singh, A. N. (2019). Oxidative stress and biomarker of TNF- $\alpha$ , MDA and FRAP in hypertension. *Journal of Medicine and Life*, 12(3), 253–259. <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0031>
- Vettorazzi, A., López de Cerain, A., Sanz-Serrano, J., Gil, A. G., & Azqueta, A. (2020). European Regulatory Framework and Safety Assessment of Food-Related Bioactive Compounds. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/nu12030613>
- Vilaça, R., Mendes, V., Mendes, M. V., Carreto, L., Amorim, M. A., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., & Costa, V. (2012). Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. *PloS One*, 7(9), e45494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045494>
- Villegas, B., Tárrega, A., Carbonell, I., & Costell, E. (2010). Optimising acceptability of new prebiotic low-fat milk beverages. *Food Quality and Preference - FOOD QUAL PREFERENCE*, 21, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.03.001>
- Wang, D. D., Li, Y., Chiuve, S. E., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2016). Association of Specific Dietary Fats With Total and Cause-Specific Mortality. *JAMA Internal Medicine*, 176(8), 1134–1145. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.2417>
- Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S., & Wei, J. (2017). A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT*, 75, 93–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.047>
- Wang, Y.-J., Yeh, T.-L., Shih, M.-C., Tu, Y.-K., & Chien, K.-L. (2020). Dietary Sodium Intake and Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Nutrients*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/nu12102934>
- Weitner, T., Inić, S., Jablan, J., Gabričević, M., & Domijan, A. (2016). Spectrophotometric Determination of Malondialdehyde in Urine Suitable for Epidemiological Studies. *Croatica Chemica Acta*, 89. <https://doi.org/10.5562/cca2902>
- WHO. (2020). *Reducir el consumo de sal*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>

- WHO. (2021). *Cardiovascular disease*. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L. J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J. A., De Vries, W., Majele Sibanda, L., ... Murray, C. J. L. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, *393*(10170), 447–492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4)
- Wsol, A., Wojno, O., Puchalska, L., Wrzesien, R., Szczepanska-Sadowska, E., & Cudnoch-Jedrzejewska, A. (2019). Impaired hypotensive effects of centrally acting oxytocin in SHR and WKY rats exposed to chronic mild stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *318*(1), R160–R172. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00050.2019>
- Xu, N., Jiang, S., Persson, P. B., Persson, E. A. G., Lai, E. Y., & Patzak, A. (2020). Reactive oxygen species in renal vascular function. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *229*(4), e13477. <https://doi.org/10.1111/apha.13477>
- Xu, Q., Hong, H., Wu, J., & Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *86*, 399–411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.050>
- Xu, T., Yu, X., Ou, S., Liu, X., Yuan, J., Tan, X., & Chen, Y. (2017). Adherence to Antihypertensive Medications and Stroke Risk: A Dose-Response Meta-Analysis. *Journal of the American Heart Association*, *6*(7). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006371>
- Yalcin, G., & Lee, C.-K. (2019). Recent studies on anti-aging compounds with *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *Translational Medicine of Aging*, *3*, 109–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tma.2019.10.001>
- Yang, H.-Y., Yang, S.-C., Chen, S.-T., & Chen, J.-R. (2008). Soy protein hydrolysate ameliorates cardiovascular remodeling in rats with l-NAME-induced hypertension. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*(12), 833–839. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.004>
- Yang, J., & Lee, J. (2019). Application of Sensory Descriptive Analysis and Consumer Studies to Investigate Traditional and Authentic Foods: A Review. In *Foods* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/foods8020054>
- Yang, Q., Zhang, Z., Gregg, E. W., Flanders, W. D., Merritt, R., & Hu, F. B. (2014). Added Sugar Intake and Cardiovascular Diseases Mortality Among US Adults. *JAMA Internal Medicine*,



- 174(4), 516–524. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.13563>
- Ye, Y., Li, J., & Yuan, Z. (2013). Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS One*, 8(2), e56803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056803>
- Zhang, C., Zhang, N. N., Li, Z. Y., Tian, Y. T., Zhang, L. T., & Zheng, B. D. (2017). Antioxidant Efficacy of Protein Hydrolysates from Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*) in D-galactose-Induced Aging Mice. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(1), 17–28. <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1082525>
- Zhang, M., Mu, T.-H., & Sun, M.-J. (2012). Sweet potato protein hydrolysates: antioxidant activity and protective effects on oxidative DNA damage. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(11), 2304–2310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03103.x>
- Zhubi-Bakija, F., Bajraktari, G., Bytyçi, I., Mikhailidis, D. P., Henein, M. Y., Latkovskis, G., Rexhaj, Z., Zhubi, E., Banach, M., Alnouri, F., Amar, F., Atanasov, A. G., Bajraktari, G., Banach, M., Bartłomiejczyk, M. A., Bjelakovic, B., Bruckert, E., Cafferata, A., Ceska, R., ... Zirlik, A. (2021). The impact of type of dietary protein, animal versus vegetable, in modifying cardiometabolic risk factors: A position paper from the International Lipid Expert Panel (ILEP). *Clinical Nutrition*, 40(1), 255–276. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.017>
- Zimmermann, A., Hofer, S., Pendl, T., Kainz, K., Madeo, F., & Carmona-Gutierrez, D. (2018). Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS Yeast Research*, 18(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy020>
- Zuo, J., & Jiang, Z. (2020). Melatonin attenuates hypertension and oxidative stress in a rat model of L-NAME-induced gestational hypertension. *Vascular Medicine (London, England)*, 25(4), 295–301. <https://doi.org/10.1177/1358863X20919798>