

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y  
ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE CAÑIHUA  
(*Chenopodium pallidicaule* AELLEN) MEDIANTE ESTUDIOS *in vivo*”**

Presentado por:

**KATTYA JAZMÍN POMA PARI**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima - Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y  
ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE CAÑIHUA  
(*Chenopodium pallidicaule* AELLEN) MEDIANTE ESTUDIOS *in vivo*”**

Presentado por:

**KATTYA JAZMÍN POMA PARI**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INGENIERO EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

---

Ph.D. Ritva Ann Mari Repo de Carrasco

**PRESIDENTE**

---

Dra. Ana Consuelo Aguilar Galvez

**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. Laura del Rosario Linares García

**MIEMBRO**

---

Dra. Rosana Sonia Chirinos Gallarado

**ASESORA**

---

Dra. Indira Milagros Betalleluz Pallardel

**CO-ASESORA**

Lima - Perú

2018

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Elias y Catalina, por su incondicional apoyo, amor, comprensión y ser mi fortaleza, y a mis hermanos, Carmen y Raúl por su apoyo y cariño.

## AGRADECIMIENTO

- A mi asesora, Dra. Rosana Chirinos, por todo el apoyo, los conocimientos compartidos y ser guía durante todas las etapas del desarrollo del presente trabajo. Asimismo muchas gracias por la oportunidad y confianza depositada en mí.
- A mi co-asesora, Dra. Indira Betalleluz, por todo el apoyo, guía, cariño y consejos brindados durante el desarrollo y redacción del presente trabajo. Muchas gracias especialmente por ayudarme y ser guía en toda la parte experimental *in vivo*.
- A mis amigos, del colegio, de la universidad e Instituto de Biotecnología, en especial a mis amigas tesistas que están desde la etapa universitaria hasta el momento, gracias por su compañía, apoyo y anécdotas durante toda esta etapa.
- Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación a través del Proyecto N° 354-PNICP-PIAP-2014, titulado: "Estudio de la biotransformación enzimática de la proteína de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) para la obtención de péptidos bioactivos, con actividades antihipertensiva, antioxidante y antihipercolesterolemica"

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

### *ABSTRACT*

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1.	CAÑIHUA.....	3
2.1.1.	GENERALIDADES.....	3
2.1.2.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y VARIABILIDAD GENÉTICA .....	4
2.1.3.	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL.....	4
2.2.	HIDROLIZADO PROTEICO.....	5
2.2.1.	PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	7
2.2.2.	TIPOS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	7
2.2.3.	IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LA SALUD .....	9
2.3.	HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	10
2.3.1.	PROBLEMA DE SALUD.....	10
2.3.2.	CAUSA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL .....	11
2.3.3.	MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	11
2.3.4.	SISTEMA ENDOTELINA .....	12
2.3.5.	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	12
2.3.6.	AGENTES ANTIHIPERTENSIVOS .....	14
2.4.	HIPERCOLESTEROLEMIA.....	16
2.4.1.	PROBLEMA DE SALUD.....	16
2.4.2.	CAUSA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA .....	17
2.4.3.	MECANISMO DE REGULACIÓN DEL COLESTEROL.....	17
2.4.4.	AGENTES HIPOCOLESTEROLÉMICOS.....	18

2.5.	ESTRÉS OXIDATIVO .....	20
2.5.1.	PROBLEMA DE SALUD.....	20
2.5.2.	CAUSAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	21
2.5.3.	MECANISMO DE REGULACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL OXÍGENO (ERO) .....	21
2.5.4.	ANTIOXIDANTES EXÓGENOS .....	23
2.6.	ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA CARACTERIZAR PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	24
2.6.1.	ESTUDIO <i>in vitro</i> .....	24
2.6.2.	ESTUDIO <i>in vivo</i> .....	25
2.6.3.	MODELO ANIMAL RATA .....	25
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	27
3.2.	MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	27
3.3.	MODELO ANIMAL.....	27
3.4.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	28
3.4.1.	MATERIALES.....	28
3.4.2.	EQUIPOS .....	28
3.4.3.	REACTIVOS.....	29
3.5.	MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	30
3.5.1.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	30
3.5.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL .....	30
3.5.3.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE .....	30
3.5.4.	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS .....	31
3.5.5.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS (2,2 AZINOBIS (3-ETHYLBENZOTHAZOLINO 6-SULFONATO)).....	32
3.5.6.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA .....	33

3.5.7.	DETERMINACIÓN DEL IC <sub>50</sub> .....	33
3.5.8.	MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL NO INVASIVA.....	34
3.5.9.	DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO .....	34
3.5.10.	ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA .....	36
3.6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	37
3.6.1.	OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA .....	37
3.6.2.	EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE .....	39
3.6.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
3.6.4.	MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y ANTIOXIDANTE .....	42
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	45
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
4.1.	OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA .....	46
4.2.	EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA .....	47
4.3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y ANTIOXIDANTE <i>in vivo</i> .....	50
4.3.1.	ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	50
4.3.2.	ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA .....	58
4.3.3.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	64
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Contenido de aminoácidos en granos andinos y cereal .....	6
Cuadro 2: Péptidos bioactivos derivados de alimentos con actividad biológica.....	9
Cuadro 3: Estudios <i>in vivo</i> empleando modelo rata para diversos estudios de actividad biológica de péptidos.....	26
Cuadro 4. Cantidad de cada solución para la muestra y blanco 1, 2 y 3 .....	36
Cuadro 5: Descripción de los grupos para el estudio antihipertensivo.....	41
Cuadro 6: Descripción de los grupos para el estudio hipocolesterolemico y antioxidante .	42
Cuadro 7: Características del hidrolizado proteico de cañihua .....	46
Cuadro 8: Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antihipertensiva y antioxidante del hidrolizado proteico de cañihua.....	47
Cuadro 9: Control de peso corporal de ratas para el estudio antihipertensivo .....	51
Cuadro 10: Evolución de la presión arterial sistólica de ratas para el estudio antihipertensivo .....	53
Cuadro 11: Evolución de la presión arterial diastólica de ratas para el estudio antihipertensivo .....	57
Cuadro 12: Peso corporal de ratas para el estudio hipocolesterolémico y antioxidante.....	59
Cuadro 13: Perfil lipídico en suero de ratas para el estudio hipocolesterolémico.....	59
Cuadro 14: Estudio antioxidante en suero de ratas hipercolesterolémicas.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Funciones fisiológicas de los péptidos bioactivos .....	8
Figura 2: Actividad de la ECA en el Sistema Renina-Angiotensina y del Sistema Calicreína-Cinina .....	14
Figura 3: Diseño experimental para la evaluación de hidrolizado proteico de cañihua con actividad antihipertensiva, hipocolesterolémica y antioxidante .....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVAS ESTÁNDAR EMPLEADAS EN LA OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA .....	89
ANEXO 2: PROTOCOLO NIBP PARA MEDIR LA PRESIÓN EN LA COLA DE RATAS .....	89
ANEXO 3: MEDICIÓN DE PRESIÓN EN LA COLA DE LA RATA.....	90
ANEXO 4: COMPOSICIÓN DE DIETA ESTÁNDAR PARA RATAS.....	91
ANEXO 5: GANANCIA PESO DE RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	92
ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA GANANCIA DE PESO DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	93
ANEXO 7: PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	94
ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	96
ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA CERO .....	98
ANEXO 10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO CONTROL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	98
ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO ...	98
ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + CAPTOPRIL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	100
ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + HPC EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	101
ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA SEIS.....	102
ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 12 .....	103

ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 18 .....	104
ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 24 .....	105
ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 30.....	106
ANEXO 19: PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE LAS RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO.....	108
ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	110
ANEXO 21: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA CERO .....	112
ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA SEIS.....	112
ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 12 .....	113
ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 18 .....	114
ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 24 .....	116
ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 30.....	117
ANEXO 27: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO CONTROL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	118
ANEXO 28: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .	118
ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + CAPTOPRIL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO .....	119
ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + HPC EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO.....	121

ANEXO 31: GANANCIA DE PESO DE RATAS DURANTE EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO Y ANTIOXIDANTE .....	122
ANEXO 32: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA GANANCIA DE PESO DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO Y ANTIOXIDANTE .....	123
ANEXO 33: PERFIL LIPÍDICO EN EL SUERO DE LAS RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLEMICO .....	123
ANEXO 34: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL TOTAL (CT) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO .....	124
ANEXO 35: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRIGLICÉRIDOS TOTALES (TT) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO .....	125
ANEXO 36: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL-HDL (C-HDL) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO .....	126
ANEXO 37: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL-LDL (C – LDL) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO .....	127
ANEXO 38: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL-VLDL (C-VLDL) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO .....	128
ANEXO 39: ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA EN EL SUERO DE LAS RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIOXIDANTE.....	129
ANEXO 40: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIOXIDANTE .....	130

## RESUMEN

En el presente estudio, se obtuvo un hidrolizado proteico de cañihua (HPC) con actividad antioxidante y antihipertensiva *in vitro* de  $2.08 \pm 0.05$   $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína,  $76.72 \pm 4.38$  por ciento de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) e  $\text{IC}_{50}$  de  $0.10 \pm 0.01$   $\text{mg/mL}$ , respectivamente, el cual se empleó en ratas para evaluar *in vivo* las posibles actividades antihipertensiva, hipocolesterolémica y antioxidante a una administración oral de 100 mg de proteína de HPC/kg de peso corporal. Los resultados mostraron que el HPC presentó actividad antihipertensiva al reducir significativamente la presión arterial sistólica y diastólica de  $184.4 \pm 10.9$  a  $161.6 \pm 8.7$  mm Hg y de  $155.2 \pm 19.4$  a  $138.8 \pm 9.9$  mm Hg, respectivamente, en referencia a las ratas hipertensas inducidas con L-NAME. Por otro lado, el HPC no presentó una actividad hipocolesterolémica significativa de acuerdo al perfil lipídico, redujo significativamente los niveles séricos de colesterol total (CT), triglicéridos totales (TT) y colesterol-VLDL (C-VLDL); sin embargo, no incrementó el contenido de colesterol-HDL (C-HDL) y no se evidenció una disminución significativa del colesterol-LDL (C-LDL) con respecto a las ratas con hipercolesterolemia inducida con dieta rica en colesterol (HCD), quienes presentaron CT ( $106.5 \pm 12.3$  mg/dL), TT ( $82.3 \pm 16.9$  mg/dL), C-HDL ( $40.3 \pm 4.9$  mg/dL), C-LDL ( $49.5 \pm 13.5$  mg/dL) y C-VLDL ( $16.7 \pm 3.3$  mg/dL), mientras que las ratas con HCD presentaron CT ( $131.2 \pm 9.2$  mg/dL), TT ( $117.2 \pm 29.5$  mg/dL), C-HDL ( $53.3 \pm 10.2$  mg/dL), C-LDL ( $54.5 \pm 14.4$  mg/dL) y C-VLDL ( $23.3 \pm 5.7$  mg/dL). Por último, el HPC presentó actividad antioxidante en ratas con HCD al mantener la actividad antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD) respecto al grupo control, con un valor de  $1.76 \pm 0.19$  U/mg proteína, a pesar de inducir el estrés oxidativo con la dieta rica en colesterol.

**Palabras clave:** péptidos bioactivos, hidrolizado proteico de cañihua, antihipertensivo, hipocolesterolémico, antioxidante, *in vivo*

## ABSTRACT

In the present study, a canihua protein hydrolyzate (CPH) with antioxidant and antihypertensive activity *in vitro* of  $2.08 \pm 0.05$   $\mu\text{mol TE} / \text{mg protein}$ ,  $76.72 \pm 4.38$  percent inhibition of angiotensin-I converting enzyme (ACE) and  $\text{IC}_{50}$  of  $0.10 \pm 0.01$   $\text{mg/mL}$ , respectively, which was used in rats to evaluate *in vivo* the possible antihypertensive, hypocholesterolemic and antioxidant activities of an oral administration of 100 mg of CPH protein/kg of body weight. The results showed that the CPH presented antihypertensive activity by significantly reducing the systolic and diastolic blood pressure from  $184.4 \pm 10.9$  to  $161.6 \pm 8.7$  mm Hg and from  $155.2 \pm 19.4$  to  $138.8 \pm 9.9$  mm Hg, respectively, in reference to the hypertensive rats induced with L-NAME. On the other hand, CPH did not present a significant hypocholesterolemic activity according to the lipid profile, significantly reducing serum levels of total cholesterol (TC), total triglycerides (TT) and VLDL-cholesterol (VLDL-C); however, the content of HDL-cholesterol (HDL-C) did not increase and there was no significant decrease in LDL-cholesterol (LDL-C) with respect to rats with high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia (HCD), presented TC ( $106.5 \pm 12.3$  mg/dL), TT ( $82.3 \pm 16.9$  mg/dL), HDL-C ( $40.3 \pm 4.9$  mg/dL), LDL-C ( $49.5 \pm 13.5$  mg/dL) and VLDL-C ( $16.7 \pm 3.3$  mg/dL), while rats with HCD presented TC ( $131.2 \pm 9.2$  mg/dL), TT ( $117.2 \pm 29.5$  mg/dL), HDL-C ( $53.3 \pm 10.2$  mg/dL), LDL-C ( $54.5 \pm 14.4$  mg/dL) and VLDL-C ( $23.3 \pm 5.7$  mg/dL). Finally, the CPH presented antioxidant activity in rats with HCD by maintaining the antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) with respect to the control group, with a value of  $1.76 \pm 0.19$  U/mg protein, despite inducing oxidative stress with the high cholesterol diet.

**Keywords:** bioactive peptides, canihua protein hydrolyzate, antihypertensive, hypocholesterolemic, antioxidant, *in vivo*

## I. INTRODUCCIÓN

Por muchos años las enfermedades infecciosas han sido la principal causa de mortalidad en el mundo; sin embargo, hoy en día las enfermedades no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares (ECV), el cáncer y la diabetes las han superado. Tal es así que las ECV en el 2012 representaron el 31 por ciento de las muertes registradas a nivel mundial. Por otro lado, se ha reportado (Erdmann *et al.* 2008, Ore 2008, OMS 2013, Malaguti *et al.* 2014, Soares de Castro y Sato 2015), que la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la hipercolesterolemia y el estrés oxidativo son factores de riesgo claves para las ECV. Por lo tanto, resulta evidente la importancia de estos factores debido a que son indicios que conllevan a adquirir una ECV.

Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos naturales con posibles beneficios en el tratamiento y/o prevención de la aparición de las ECV. Recientemente, hay una tendencia creciente e interés en el uso de los péptidos derivados de proteína de alimentos como agentes de intervención contra las enfermedades crónicas, incluyendo las ECV, la diabetes, la inflamación y el cáncer; y para el mantenimiento del bienestar general (Malaguti *et al.* 2014). Siendo los péptidos bioactivos antihipertensivos, hipocolesterolémicos y antioxidantes estudiados para beneficiar al sistema cardiovascular.

Los péptidos derivados de granos andinos han ganado un mayor reconocimiento en las áreas de ciencias de la alimentación y nutrición por sus posibles beneficios en el tratamiento y/o prevención de la aparición de enfermedades (Udenigwe y Aluko 2012). Siendo la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) uno de los granos andinos menos estudiados y más nutritivos, debido a que su alto contenido y calidad proteica entre los granos andinos (14-19%), así como también es rico en micronutrientes tales como hierro y calcio (Apaza 2010).

En un estudio previo, Ochoa (2017) evaluó la actividad antioxidante y antihipertensiva *in vitro* del hidrolizado proteico a partir de la proteína de la cañihua obteniendo resultados

interesantes. Sin embargo, para conocer la actividad biológica de un alimento o parte de ello, se requiere de estudios *in vivo*, debido a que la evaluación *in vitro* no siempre se refleja en el humano (Malaguti *et al.* 2014). Es por ello que se requiere de estudios *in vivo* empleando el hidrolizado proteico de cañihua a fin de verificar su actividad en un modelo animal (rata), estudio que ha sido abordado en la presente investigación, la misma que tuvo como objetivo principal evaluar la actividad biológica antihipertensiva, hipocolesterolémica y antioxidante de péptidos provenientes del hidrolizado proteico de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en ratas y como objetivos específicos: (1) Caracterizar los péptidos del hidrolizado proteico de cañihua con respecto a la actividad antioxidante y antihipertensiva mediante estudios *in vitro*, (2) Evaluar la actividad antihipertensiva de los péptidos del hidrolizado proteico de cañihua en ratas de forma no invasiva, (3) Determinar la actividad hipocolesterolémica de los péptidos del hidrolizado proteico de cañihua en las ratas a través del perfil lipídico en el suero, (4) Evaluar la actividad antioxidante de los péptidos del hidrolizado proteico de cañihua en ratas por medio del estrés oxidativo en el suero.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. CAÑIHUA**

#### **2.1.1. GENERALIDADES**

La cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), conocida también como cañagua o cañahua, es un grano andino originario del altiplano. Este grano andino tuvo especial relevancia para los habitantes en el altiplano peruano-boliviano, donde se desarrolló la cultura Tiahuanaco y es donde actualmente existen mayores extensiones cultivadas con esta especie, siendo Puno la provincia que produce más del 90 por ciento, seguido de las zonas altas de Cuzco y por último Arequipa a menor escala (Higinio 2011, INEI 2014, Apaza 2010).

Este cultivo presenta múltiples cualidades, por su gran capacidad de adaptación a las condiciones agroecológicas difíciles soportando temperaturas muy bajas y sequías, por su alto valor nutricional contenido en sus granos y por presentar amplia variabilidad genética, constituyéndose de esta manera en uno de los cultivos andinos potenciales para garantizar la seguridad alimentaria tanto en cantidad, calidad y oportunidad para la población que está en constante crecimiento; razones por las cuales ha despertado en la actualidad gran interés (Blanco *et al.* 2005, Apaza 2010).

Al igual que la quinua, la cañihua produce una semilla similar a un cereal, pero no es considerada como tal. La semilla es en realidad un fruto de paredes duras (aquenio), que contiene a la semilla, de aproximadamente 1-1.2 mm de diámetro, la mitad del tamaño de los granos de quinua. El fruto está cubierto por un perigonio (cáliz persistente), generalmente de color gris, el cual se desprende con facilidad a la madurez y en algunos casos puede permanecer adherido al grano incluso después de la trilla dificultando la selección (Repo-Carrasco *et al.* 2009).

La cañihua está estrechamente relacionada con la quinua, debido a que pertenecen a la misma familia y fue considerada una variedad de quinua hasta que Aellen en 1929 lo clasificó como una especie propia.

### 2.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y VARIABILIDAD GENÉTICA

La cañihua presenta la siguiente clasificación taxonómica (Mujica *et al.* 2002):

Reino : Vegetal, *Eukariota*  
División : Angiospermophyla  
Clase : Dicotyledoneae  
Sub Clase : Archichlamydeae  
Orden : Centrospermales  
Familia : Chenopodaceae  
Género : *Chenopodium*  
Especie : *Chenopodium pallidicaule* Aellen

La cañihua muestra una amplia variabilidad genética, la cual se puede apreciar en los colores de las plantas y semillas principalmente, variando desde el color amarillo y naranja como los más claros, llegando hasta el color púrpura como el más oscuro, con todas las tonalidades intermedias (Estaña y Muñoz 2012). Algunos de los cultivares conocidos en Perú son: Cupis, Ramis, Akallapi, Huanaco, Rosada, Chillihua, Condorsaya, K'ellu y Puca. En Bolivia, los cultivares incluyen Kanallapi, Chusllunca e Issualla. Existen colecciones de germoplasma en las estaciones experimentales INIA de Camacani e Illpa (Puno), la Universidad San Antonio Abad en K'ayra (Cusco) en Perú; y en Bolivia en la Universidad de Patacamaya en el Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria (IBTA) donde se almacenan en frío más de 380 accesiones (FAO 1994). En la estación experimental Illpa/INIAA en Puno, se han seleccionado las variedades Ramis, Cupi y Lampa (Tapia y Fries 2007).

### 2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL

La cañihua se caracteriza por su alto contenido de proteínas, llegando a superar a otros granos andinos como la quinua y kiwicha, y cereales como el centeno y avena. Badui (2006) menciona que existen dos factores que determinan el valor nutricional de las proteínas, el contenido proteico y la calidad de la proteína. El contenido proteico de la cañihua varía de 13.7 a 18.8 por ciento, dependiendo de la variabilidad genética, edad de maduración de la planta, localización, cultivo y fertilidad del suelo (Tapia 1990, Blanco *et al.* 2005, Apaza 2010). Asimismo la calidad proteica es considerable, debido a que contiene una proporción importante de aminoácidos esenciales, entre los que destaca la lisina (~7.1 %), aminoácido escaso en los alimentos de origen vegetal, que forma parte del cerebro humano. Además

tiene una proporción importante de aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Repo-Carrasco *et al.* 2009, Blanco *et al.* 2005). Por otro lado, la cañihua contiene un considerable porcentaje de fibra superior a la quinua y kiwicha con 6.1 por ciento. En cuanto al contenido de grasas este varía de 4.5 a 8.4 por ciento, siendo relativamente rica en aceite que contiene principalmente ácidos grasos insaturados (Mujica *et al.* 2002).

La importancia de las proteínas de granos andinos está basada en su calidad. Existen 22 aminoácidos que conforman las proteínas y que son fisiológicamente importantes, de ellos el organismo sintetiza 14 a partir del adecuado suministro de nitrógeno y los que no pueden ser sintetizados (aminoácidos esenciales) a la velocidad y cantidad requerida, son suministrados a través de ciertos alimentos en la dieta, los cuales son: leucina (Leu), isoleucina (Ile), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), y para los lactantes se considera a la histidina (His) (Tapia y Fries 2007). En el Cuadro 1 se muestran la composición de aminoácidos esenciales de cañihua, quinua y kiwicha en comparación al trigo.

## **2.2. HIDROLIZADO PROTEICO**

Es el producto de la hidrólisis, el cual contiene péptidos bioactivos de cadena corta (dipéptidos y tripéptidos), cadena larga (polipéptidos), aminoácidos libres y enzima inactivada (Saadi *et al.* 2015). La hidrólisis puede ser química o enzimática, siendo la hidrólisis enzimática la que presenta ventajas frente a la hidrólisis química, entre ellas su selectividad debido a que son específicas para un tipo determinado de enlace, se puede controlar condiciones del proceso (pH, temperatura y tiempo), lo cual optimiza la obtención de péptidos bioactivos y, por tanto, es poco frecuente la aparición de productos de degradación, ausencia de sustancias extrañas, y conserva el valor nutricional (Galicia *et al.* 2013).

**Cuadro 1: Contenido de aminoácidos en granos andinos y cereal**

Aminoácidos	g/100 g de proteína					
	Cañihua	Quinua	Kiwicha	Trigo	FAO/OMS <sup>1</sup>	FAO/OMS <sup>2</sup>
Triptófano	0.9	1.5	1.1	1.1	0.7	0.6
Metionina + Cisteína	4.6	3.4	6.1	4.0	2.5	2.2
Treonina	3.3	3.8	3.3	2.9	2.7	2.3
Isoleucina	3.4	3.2	3.2	3.3	3.1	3.0
Valina	4.2	3.9	3.8	4.4	4.1	3.9
Lisina	5.3	5.1	6.0	2.9	5.2	4.5
Fenilalanina + Tirosina	6.0	6.3	6.4	7.5	4.6	3.8
Leucina	6.1	7.9	5.4	6.7	6.3	5.9
Histidina	2.7	2.4	2.4	2.3	1.8	1.5

1: Patrón de aminoácidos de referencia para niños de uno a dos años (FAO/UNU/OMS 2007)

2: Patrón de aminoácidos de referencia para adultos (FAO/UNU/OMS 2007)

FUENTE: Tomado de Walters (2013)

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo empleando enzimas de diferentes fuentes tales como el tracto gastrointestinal, plantas y microorganismos, así como de la fermentación microbiana en múltiples rutas, los cuales han mostrado un impacto significativo en la diversificación biológica, debido a que se han contribuido significativamente a enzimas para la obtención de fragmentos peptídicos multifuncionales (Korhonen y Pihlanto 2006).

Las enzimas pancreáticas han sido usadas para liberar muchos péptidos bioactivos de las proteínas de la dieta; otras enzimas y combinaciones incluyendo alcalasa, quimotripsina pancreática y pepsina, así como enzimas de fuentes bacterianas y fúngicas han sido aplicadas para generar péptidos bioactivos a partir de varias fuentes proteicas (cereales, leguminosas, productos lácteos, cárnicos, etc.). Por otro lado, se ha reportado que se pueden liberar péptidos bioactivos también por hidrólisis durante la elaboración o el procesamiento de algunos alimentos (quesos y sueros de quesería) por acción de enzimas bacterianas, o por acción de enzimas proteolíticas nativas (leche) (Korhonen y Pihlanto 2006). Por lo tanto, se puede mencionar que la hidrólisis enzimática ha sido la forma más común, rápida y segura

para la producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas enteras (Korhonen y Pihlanto 2006, Soares de Castro y Sato 2015).

### **2.2.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteína cuya secuencia de aminoácidos presentan actividad biológica; pudiendo ser antioxidantes, antihipertensivos, hipocolesterolémicos, antimicrobianos, antiinflamatorios y otros. Dichos péptidos contienen entre 2-20 aminoácidos y una masa molecular menor a 6000 Da. Estos pueden ser obtenidos a partir de proteínas vegetales o animales (Korhonen y Pihlanto 2006, Soares de Castro y Sato 2015).

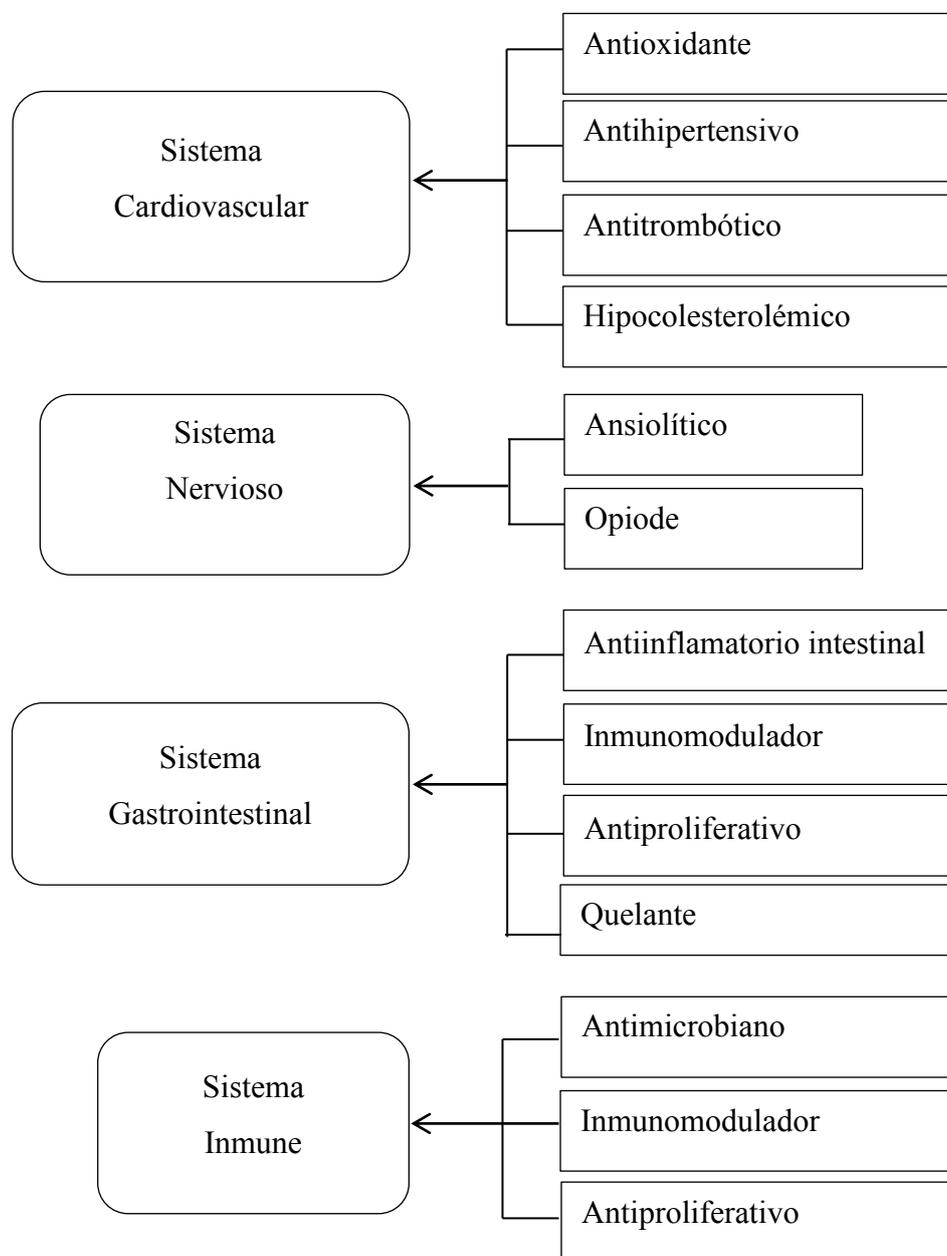
Estas cadenas cortas de aminoácidos no presentan actividad biológica dentro de la proteína intacta, pero pueden ser liberados durante la digestión gastrointestinal o procesamiento previo del alimento, como por ejemplo, mediante la fermentación o hidrólisis enzimática, siendo esta última la manera más segura y fácil de controlar la producción de dichos péptidos (Soares de Castro y Sato 2015, Korhonen y Pihlanto 2006). Esta hidrólisis incrementa la exposición de grupos hidrofílicos y facilita la interacción de aminoácidos hidrofílicos con el ambiente acuoso (Aluko y Monu 2003). Mediante la ingesta oral, los péptidos bioactivos tienen influencia sobre el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, dependiendo de la secuencia de aminoácidos involucrada (Korhonen y Pihlanto 2006).

### **2.2.2. TIPOS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Los péptidos son clasificados de acuerdo a la fuente proteica, tipo de enzima empleada y condiciones de procesado y la actividad biológica. Según ello, los péptidos obtenidos presentan diferentes actividades (Segura-Campos *et al.* 2013). En la Figura 1 se puede observar las diversas funciones de los péptidos bioactivos en los sistemas del organismo.

Se ha reportado en la literatura algunos ejemplos de la actividad de los péptidos bioactivos que han sido obtenidos de diferentes fuentes (Cuadro 2). Los péptidos bioactivos de fuente animal han sido extraídos a partir de proteínas derivados de la leche, huevo, carne, entre otros; y entre los de fuente vegetal a partir de la soja, trigo, maíz, arroz, cebada y girasol (Pihlanto y Korhonen 2003, Mulero *et al.* 2011). Dentro de esta última fuente, se reconoce que la cañihua presenta un contenido proteico mayor a otros granos andinos y cereales; sin

embargo, solo se cuentan con pocos estudios que evidencian el potencial de la cañihua como portador de péptidos bioactivos.



**Figura 1: Funciones fisiológicas de los péptidos bioactivos**

FUENTE: Adaptado de Hernández – Ledesma *et al.* (2014) y Korhonen y Pihlanto (2006)

A la fecha los péptidos bioactivos de este grano andino han sido estudiados por su actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina - I (ECA) y por sus propiedades antioxidantes *in vitro* (Ochoa 2017).

**Cuadro 2: Péptidos bioactivos derivados de alimentos con actividad biológica**

Actividad fisiológica	Fuente alimentaria	Secuencia peptídica/nombre
Antihipertensivo/ inhibidores de ECA	soya	NWGPLV
	pescado	LKP, IKP, LRP (derivado de sardina, atún y bonito)
	carne	IKW, LKW
	leche	Lactoquininas (WLAHK, LRP, LKP)
		Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP)
Inmunomodulador	trigo	IAP
		Inmunopéptidos
	brocoli	YPK
	arroz	GYPMYPLR
	leche	Inmunopéptidos
Hipocolesterolémico	soya	LPYPR
	leche	IIAEK
Antioxidante	pescado	MY
	leche	MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI
	trigo	Péptidos no especificados
Antimicrobiano	huevo	Fragmentos (109-200)
	leche	Lactoferricina

FUENTE: Tomado de Hartmann y Meisel (2007)

### 2.2.3. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LA SALUD

Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, los péptidos con actividad biológica podrían ayudar a reducir la actual epidemia de enfermedades crónicas degenerativas que afectan a un amplio sector de la población mundial, es por ello que diversos estudios investigan ciertos compuestos de los alimentos que pueden beneficiar a reducir síntomas o problemas de salud (OMS 2003).

Estudios recientes han relacionado la prevalencia de enfermedades cardiovasculares, obesidad, hipertensión, diabetes y cáncer a factores nutricionales. Es así que, en respuesta a

una mayor conciencia de la relación entre alimentos y salud, el mercado de alimentos funcionales y compuesto bioactivos se ha expandido (Soares y Sato 2015). El impulso creciente de varias enfermedades comunes como: el infarto de miocardio, los trastornos cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares, la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis, se han convertido en una seria preocupación mundial. Por lo tanto, los recientes desarrollos en el campo de la proteómica que ofrecen soluciones prometedoras para resolver tales problemas de salud estimula el uso de los péptidos bioactivos como uno de los agentes terapéuticos y/o preventivos para aliviar los factores de riesgo relacionados con la enfermedad (Saadi *et al.* 2015).

## **2.3. HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

### **2.3.1. PROBLEMA DE SALUD**

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos arteriales al ser bombeada por el corazón y representa la energía potencial que impulsa la sangre por el aparato circulatorio. Durante la sístole del ventrículo izquierdo, la sangre es impulsada hacia la arteria aorta generando un aumento de la presión sanguínea que corresponde a la presión arterial sistólica (PAS), a continuación se inicia una disminución de la presión, que alcanza su mínimo durante la diástole ventricular, la presión arterial diastólica (PAD) (Pereira 2010). Una persona adulta y sana muestra valores de presión o presión arterial en reposo de 120 mm Hg cuando el corazón se contrae (presión arterial sistólica) y de 80 mm Hg cuando el corazón se relaja (presión arterial diastólica) (Fernández 2015).

La hipertensión se define como una elevación crónica de la presión arterial por encima de los valores normales. Esta patología constituye un problema de gran importancia en la salud (Aleixandre y Miguel 2009). En la actualidad la hipertensión arterial afecta cerca de la cuarta parte de la población mundial y se estima que alcanzará al 29 por ciento para el año 2025. A pesar de ser una enfermedad controlable, está asociada con enfermedades como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, falla renal y accidentes cerebrovasculares (ACV), causas importantes de mortalidad (Hartmann y Meisel 2007, Herrera *et al.* 2014, Soares de Castro y Sato 2015).

### **2.3.2. CAUSA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

La hipertensión es de origen multifactorial, existe un gran número de factores que han sido muy estudiados como la relación del aumento de la presión arterial por la ingesta de sal, obesidad, resistencia a la insulina, alteración del Sistema Renina Angiotensina (SRA) y el Sistema Nervioso Simpático (SNS) (Maicas *et al.* 2003, Soares de Castro y Sato 2015).

En el caso de la ingesta excesiva de sodio, se produce un aumento del volumen sanguíneo por retención renal de sodio y agua, que como consecuencia incrementa la precarga y produce la elevación de la presión arterial. Por otro lado, en la obesidad el mecanismo de producción de la hipertensión es complejo e involucra a múltiples sistemas, como incremento del SRA, aumento del SNS y resistencia a la insulina. En suma, la obesidad está asociada con un incremento de la reabsorción de sodio y expansión del volumen plasmático. En el caso de la insulina, esta favorece la retención renal de sodio por tanto aumento del volumen intravascular e incrementa la actividad del SNS (Maicas *et al.* 2003).

### **2.3.3. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL**

La regulación de la presión arterial es compleja, interviniendo diversos sistemas de control en múltiples localizaciones sistémicas que están interrelacionados entre sí. Por una parte está el control a corto plazo, muy rápido y llevado a cabo por el sistema nervioso autónomo, actuando sobre el gasto cardíaco y la resistencia periférica. Por otro lado, la regulación a medio y largo plazo de la presión arterial es llevada a cabo por el sistema de control renal de los líquidos corporales mediante mecanismos hormonales de los que forman parte el sistema renina-angiotensina (SRA), el sistema calicreína-cinina (SCC) y el sistema endotelina (ET).

Estos sistemas generan diversos péptidos vasorreguladores que, de forma colectiva y a través de su unión a receptores específicos localizados en diferentes tejidos, son capaces de modular la presión, los fluidos y el balance de electrolitos (Fernández 2015). Justamente, de esta manera actúan los fármacos antihipertensivos y los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias. En este contexto, destacan el SRA y el sistema ET, siendo actualmente el SRA el objetivo principal de la farmacología para el tratamiento de la hipertensión, en la cual la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) juega un rol importante (Elavarasan *et al.* 2016).

#### **2.3.4. SISTEMA ENDOTELINA**

El endotelio vascular juega un papel fundamental en el control del tono vascular a través de la secreción de factores relajantes y contráctiles. Las células endoteliales responden a la estimulación física produciendo por un lado sustancias vasodilatadoras como la bradiquinina y el óxido nítrico (ON) y otros, que fisiológicamente son el principal regulador del tono vascular. Y por otro lado, los vasoconstrictores tales como la angiotensina-II (ang-II) y la endotelina (Lahera *et al.* 2000, Nguelefack *et al.* 2009).

#### **2.3.5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

Es bien conocido el importante papel que el SRA desempeña en el desarrollo, mantenimiento y complicaciones de la hipertensión arterial. Por ello, la interrupción del sistema y el bloqueo de la acción de la ang-II son unos de los enfoques terapéuticos principales en la hipertensión arterial y en la patología cardiovascular (Lahera *et al.* 2000).

El SRA es un regulador de la función cardiovascular y renal. El funcionamiento de este sistema es el siguiente: cuando la presión arterial disminuye, se libera al torrente sanguíneo la renina, una proteasa sintetizada en el riñón. En los vasos sanguíneos, la renina actúa sobre el angiotensinógeno, péptido de 14 aminoácidos sintetizado en el hígado, liberando un decapeptido inactivo, la angiotensina-I (ang-I) de secuencia DNVYIHPFHL. A continuación, se escinde el dipéptido carboxilo terminal (C-terminal) de la ang-I por la acción de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA) formándose el potente octapéptido vasopresor ang-II, DNVYIHPF, que permanece en la sangre hasta ser inactivada por un conjunto de enzimas denominadas angiotensinasas.

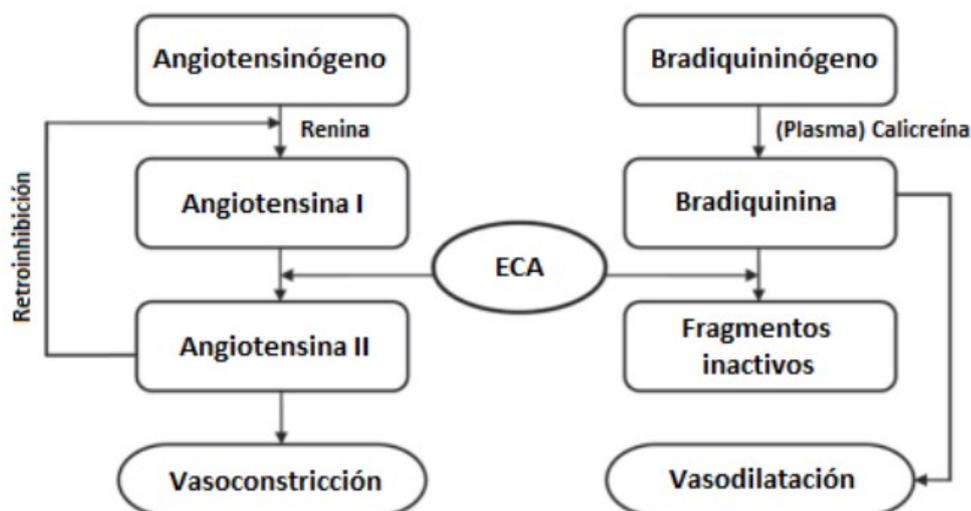
La mayor parte de las acciones atribuidas a la ang-II es la regulación de la presión arterial y el volumen sanguíneo, el balance corporal de fluidos y electrolitos durante su permanencia en la sangre, lo que provoca una serie de efectos que elevan la presión arterial (Fernández *et al.* 2014):

- La ang-II se une a los receptores AT1 situados en el músculo liso vascular, produciéndose la contracción de las arteriolas, aumentando la resistencia periférica total y la presión arterial. Este efecto se produce durante los segundos posteriores a su síntesis.

- La unión de la ang-II a los receptores situados en la corteza suprarrenal estimula la liberación de aldosterona. La aldosterona provoca un aumento de la reabsorción de sal y agua por parte de los túbulos renales. Esta disminución de la excreción de sal y agua aumenta el volumen de líquido plasmático, provocando el aumento de la presión arterial a lo largo de un período cuya duración puede oscilar entre horas y días.
- La ang-II actúa también a nivel del sistema nervioso central. Desencadena el mecanismo de la sed en el hipotálamo a través de la estimulación de la secreción de la hormona antidiurética (ADH), estimulándose a su vez el “apetito” por la sal. La mayor ingesta de agua y sal aumentan el volumen plasmático restableciéndose los valores de presión arterial.
- Por último, la ang-II actúa sobre el sistema nervioso autónomo, de manera que la interacción de ang-II con su receptor en las neuronas noradrenérgicas aumenta la frecuencia cardíaca y la resistencia periférica provocando un aumento de la presión arterial.

Además de la formación de ang-II, la ECA posee una segunda función importante para la regulación de la presión arterial hidrolizando la bradiquinina, principal péptido vasodilatador del sistema quinina-caliceína (Figura 2). Por lo tanto, al aumento de la presión arterial contribuyen la generación de ang-II que es vasoconstrictor y la hidrólisis de la bradiquinina que es vasodilatadora.

La enzima convertidora de ang-I (ECA) juega un importante rol en la regulación de la presión arterial debido a que cataliza la conversión de ang-I (forma inactiva) a ang-II (vasoconstrictor) en el SRA e inactiva la bradiquinina (vasodilatador) mediante el sistema caliceína-cinina (SCC) (Pihlanto y Korhonen 2003, Hartmann y Meisel 2007, Herrera *et al.* 2014).



**Figura 2: Actividad de la ECA en el Sistema Renina-Angiotensina y del Sistema Caliceína-Cinina.**

FUENTE: Tomado de Fernández *et al.* (2014)

### 2.3.6. AGENTES ANTIHIPERTENSIVOS

#### a. MEDICAMENTOS ANTIHIPERTENSIVOS

Como se ha mencionado, la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) desempeña un papel importante en la regulación de la presión arterial. Por consiguiente, los inhibidores sintéticos de la ECA, tales como captopril, enalapril, lisinopril y ramipril, se usan a menudo para tratar la hipertensión arterial y otras enfermedades relacionadas al corazón, siendo el captopril (D-3- mercapto-2-metilpropanoil-1-prolina;  $IC_{50} = 0.006 \mu M$ ), obtenido tras el estudio del modelo hipotético del sitio activo de la enzima, el fármaco más empleado en el control de la hipertensión arterial (Mulero *et al.* 2011, Herrera *et al.* 2014, Soares de Castro y Sato 2015).

El primer inhibidor de ECA de uso clínico fue el captopril, el cual ha sido seguido por otros inhibidores aprobados para su uso clínico y que son variaciones diseñadas para mejorar la interacción con el centro activo de la ECA. La inhibición de la ECA resultaría en un descenso de los niveles del vasoconstrictor angiotensina-II y un aumento de la concentración de bradiquinina, vasodilatadora. Sin embargo, estos inhibidores sintéticos pueden causar efectos adversos como alergias, reducida función renal, erupciones cutáneas y angioedemas (Soares de Castro y Sato 2015). Debido a esto se ha propiciado la búsqueda de fuentes

naturales de inhibidores de la ECA como pueden ser derivados de proteínas vegetales y animales (Herrera *et al.* 2014).

## **b. PÉPTIDOS BIOACTIVOS ANTIHIPERTENSIVOS**

En los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de compuestos de origen natural que puedan generar en el organismo un efecto hipotensor sin los inconvenientes efectos colaterales, siendo estudiados los péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva (Soares de Castro y Sato 2015).

Los péptidos bioactivos antihipertensivos podrían interactuar con los principales componentes de los sistemas de regulación de la presión arterial como el SRA, el sistema quinina-caliceína, y sistema ET. Se ha evidenciado que algunos péptidos alimenticios pueden inhibir el sistema renina endotelina (inhibición de la enzima convertidora de endotelina, responsable de la vasoconstricción), servir como fuentes de arginina para la producción de óxido nítrico (potente vasodilatador), por otro lado en el sistema quinina-caliceína puede estimular la actividad de la bradiquinina canales de calcio (reduciendo el flujo de  $Ca^{2+}$  a las células musculares vasculares y por ende la vasoconstricción) y en el SRA inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) y bloqueando los receptores de angiotensina (agentes hipertensivos) (Udenigwe y Mohan 2014, Korhonen y Pihlanto 2006, Maes *et al.* 2004). En la actualidad la ECA es la diana principal de los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas. Diversos estudios indican que ciertos péptidos derivados de proteínas alimentarias presentan un potente efecto inhibitor *in vitro* de la ECA, es por ello que la función más conocida y extendida de los péptidos bioactivos aislados hasta la actualidad es la inhibición de la ECA (Soares de Castro y Sato 2015).

Ko *et al.* (2012) mencionan que diversos análisis de la relación estructura-actividad entre diferentes péptidos inhibidores de la ECA demuestran que la unión a ésta es fuertemente afectada por la secuencia de los tres aminoácidos situados en el extremo C-terminal del péptido y que normalmente deben contener residuos de aminoácidos hidrofóbicos, corroborando lo mencionado por Escudero (2012), quien indica que, otra característica común de los péptidos inhibidores de la ECA es la naturaleza hidrofóbica del extremo N-terminal, debido a que los péptidos hidrofóbicos tienen gran afinidad por los sitios activos de la ECA.

Hartmann y Meisel (2007) mencionan que los péptidos inhibidores de ECA son generalmente péptidos de cadena corta, presentado a menudo residuos de aminoácidos polares como la prolina (Pro). El dipéptido alanina (Ala)-Pro y el tripéptido Phe-Ala-Pro, por ejemplo, tienen estructuras análogas a los fármacos captopril y enalapril, respectivamente. La presencia de aminoácidos aromáticos y alifáticos, tales como Pro, Phe o tirosina (Tyr) en el extremo C-terminal y de Val e Ile en la posición N-terminal de los péptidos bioactivos se han asociado con la actividad inhibidora de ECA (Soares de Castro y Sato 2015).

Diversos estudios indican que, los lácteos son fuente de numerosos péptidos antihipertensivos, por lo que se sugiere el consumo de leche y productos lácteos, ya que está inversamente relacionado con el riesgo de padecer hipertensión (Fernández 2015). Por otro lado, también se han encontrado péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de pescado, soya, huevo y carne (Hartmann y Meisel 2007). Algunos péptidos bioactivos de origen vegetal también ejercen un efecto antihipertensivo mediante la inhibición de la ECA como los cereales, las leguminosas y demás vegetales, como por ejemplo péptidos de garbanzo, del girasol, así como de la colza (Fernández *et al.* 2014).

## **2.4. HIPERCOLESTEROLEMIA**

### **2.4.1. PROBLEMA DE SALUD**

Los lípidos y el colesterol cumplen varias funciones estructurales y metabólicas pertinentes para la supervivencia de los organismos vivos. Sin embargo, concentraciones elevadas de algunos lípidos en el suero han sido asociados con un mayor riesgo de enfermedades del corazón (Udenigwe y Aluko 2012). Estos aumentos son provocados por los cambios en las vías metabólicas de los lípidos inducidos por factores ambientales y genéticos que conducen a la hipertrigliceridemia y la hipercolesterolemia, que no son enfermedades; sin embargo, son condiciones de salud que se caracterizan por triglicéridos y colesterol séricos elevados, respectivamente; los cuales son importantes factores de riesgo que podrían potencialmente contribuir al desarrollo de las ECV (Mulero *et al.* 2011, Malaguti *et al.* 2014, Ali *et al.* 2016).

La hipercolesterolemia ha surgido como un fuerte factor de riesgo de las ECV (Erdmann *et al.* 2008). La ECV es un problema grave en los países desarrollados y en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015) estimó que 17.5 millones de personas

murieron de ECV en 2012, lo que representa un 31 por ciento de todas las muertes registradas en el mundo y advirtió que 23.6 millones de personas morirán de enfermedades cardiovasculares en el 2030. La ECV es una enfermedad causada principalmente por la aterosclerosis, siendo la hipercolesterolemia uno de los factores de riesgo de la aterosclerosis y el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) es la principal causa de inicio del proceso aterogénico (Ali 2016).

#### **2.4.2. CAUSA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA**

La hipercolesterolemia es originado principalmente por una dieta rica en grasas, obesidad, antecedentes familiares (genética) y uso de hormonas, aunque cabe mencionar que hay factores que agravan esta afección como padecer diabetes, edad avanzada, falta de ejercicio, consumo de tabaco y alcoholismo (Ben-Khaled *et al.* 2012). Los niveles de colesterol sérico están influenciados por distintos factores como son la dieta, su biosíntesis, absorción y secreción (Herrera *et al.* 2014). Por lo tanto, la reducción del colesterol elevados en la sangre es importante en el manejo de la hipercolesterolemia (Navam *et al.* 2011).

#### **2.4.3. MECANISMO DE REGULACIÓN DEL COLESTEROL**

El metabolismo del colesterol se equilibra con la absorción del colesterol, síntesis de colesterol endógeno y excreción de ácidos biliares y colesterol. Para su absorción intestinal necesita ser solubilizado en forma de micelas constituidas por ácidos biliares y otros lípidos, por lo que aquellos mecanismos o sustancias que reduzcan la absorción intestinal del colesterol son considerados beneficiosos para la salud (Herrera *et al.* 2014).

Varias enzimas microsomales hepáticas están implicadas en la modificación del metabolismo del colesterol, el 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) es la enzima limitante en la síntesis de colesterol. Por otro lado, el colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1), es la enzima que cataliza la conversión del colesterol en ácidos biliares y el transporte inverso de colesterol, y la acil-CoA (colesterol aciltransferasa-ACAT); esta juega un papel importante en el ensamblaje y secreción de partículas de lipoproteína de muy baja densidad y la absorción de colesterol (Yang *et al.* 2013).

Se emplean cinco tipos de parámetros clínicos para analizar la alteración en la concentración de los lípidos séricos (colesterol y triglicéridos), los cuales son; la concentración de colesterol total (CT), la concentración de lipoproteína de baja densidad (C-LDL), la

concentración de lipoproteína de alta densidad (C-HDL), la concentración del colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (C-VLDL) y la concentración de triglicéridos totales (TT) (Herrera *et al.* 2014). Esto se debe a que, para la circulación de colesterol en la sangre, el colesterol se une a proteínas llamadas lipoproteínas como el C-HDL, C-LDL y C-VLDL, cuya función es transportar el colesterol y los triglicéridos en la sangre.

Los altos niveles de lipoproteína de baja densidad (C-LDL) se acumulan en el sub endotelial de las arterias y son altamente aterogénicas y tóxicas para las células vasculares, lo que conduce a la aterosclerosis. Además, se cree que los radicales libres peroxidativos modifican los ácidos grasos poliinsaturados del C-LDL y C-VLDL, lo que contribuye a la progresión de las lesiones ateroscleróticas. Por otro lado, C-HDL es una fracción anti-aterogénica.

Los C-VLDL y C-LDL transportan lípidos desde el hígado a los tejidos extrahepáticos como el tejido vascular, adiposo y muscular. En tanto el C-HDL, generalmente conocido como “colesterol bueno”, remueve y transporta el colesterol desde los tejidos periféricos como los vasos sanguíneos al hígado para ser eliminado, transformándose así en un factor protector del organismo para evitar la acumulación de colesterol en células y arterias (Ganong 2005). El C-LDL, por el contrario, corresponde al denominado “colesterol malo”, por cuanto es responsable de su depósito en las arterias cuando los niveles plasmáticos de colesterol están sobre los valores normales (Goodman *et al.*, citado por Biere y Tohá 2007).

#### **2.4.4. AGENTES HIPOCOLESTEROLÉMICOS**

##### **a. MEDICAMENTO ESTATINA**

Las estatinas son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la enzima limitante de la síntesis de colesterol, inhibiendo la biosíntesis intracelular hepática del colesterol y disminuyendo su depósito celular. Estos fármacos reducen los niveles de colesterol sérico y son ampliamente utilizados para tratar a los pacientes con hipercolesterolemia. El primer medicamento fue la lovastatina y de su modificación estructural se obtuvieron la simvastatina, pravastatina, fluvastatina y atorvastatina (Biere y Tohá 2007, Chegwin *et al.* 2012).

Las estatinas reducen el C-LDL entre un 20 - 35 por ciento en dosis bajas y hasta un 60 por ciento a dosis mayores. Además reducen los niveles de TT y C-VLDL entre un 10-30 por ciento (Knopp 1999, Djerrou 2014). Sin embargo, se sabe que estos fármacos

hipolipemiantes que se usan para tratar la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia presentan la posibilidad de aparición de efectos secundarios que ocasionalmente pueden ser peligrosos, entre los cuales podemos mencionar cefalea, anomalías de la función hepática, dolor abdominal, flatulencia, estreñimiento, diarrea, náuseas, vómitos, impotencia, alopecia, etc. Por lo tanto, es necesario tener sustancias con actividad hipolipemiante que contribuyan a la prevención y control de dichas patologías sin efectos adversos (Djerrou 2014, Rony *et al.* 2014).

#### **b. PÉPTIDOS BIOACTIVOS HIPOCOLESTEROLÉMICOS**

Aunque se han desarrollado varios fármacos para tratar casos graves de hipercolesterolemia en humanos, el enfoque de la dieta y la modificación del estilo de vida se han recomendado para mantener un bajo nivel sanguíneo de colesterol pro-aterogénico (Fletcher *et al.* 2005). Es por ello que, la dieta juega un papel clave en el perfil de lípidos en suero y en consecuencia se utiliza como una estrategia para prevenir o disminuir la incidencia de ECV (Erdmann *et al.* 2008).

Además, varias investigaciones se han centrado en el uso de alimentos funcionales menos tóxicos para tratar casos leves de hipercolesterolemia (Chen *et al.* 2003). Estos alimentos funcionales incluyen proteínas alimenticias enteras y purificadas, sus hidrolizados enzimáticos y péptidos constituyentes, que han sido investigados como posibles agentes dietéticos que reducen el colesterol y los lípidos en animales y seres humanos (Navam *et al.* 2011).

Estudios en proteína e hidrolizado de soya, de suero leche, de clara de huevo, trigo entre otros han mostrado efecto sobre los niveles de colesterol en sangre. En el caso de la soya compararon los efectos de la proteína e hidrolizado proteico de soya *in vitro* e *in vivo* en la disminución del colesterol, siendo los hidrolizados los que presentaron un mayor efecto (Mulero *et al.* 2011, Ben-Khaled *et al.* 2012, Herrera *et al.* 2014).

Los mecanismos exactos involucrados en la actividad hipocolesterolemia de los péptidos no se han dilucidado todavía, pero los resultados preliminares sugieren que la composición de aminoácidos puede ser clave en la influencia (Hernández-Ledesma *et al.* 2011). Por otro lado, Navam *et al.* (2011) mencionan que la hidrofobicidad juega un papel importante en la actividad de los péptidos hipocolesterolémicos, ya que pueden unirse a los ácidos biliares

por las interacciones hidrofóbicas, lo que mejora la excreción de esteroides fecales. Otros factores tales como secuencias de aminoácidos de péptidos también pueden contribuir a la actividad de reducción del colesterol, la presencia de la Gly, Cisteína (Cys), Arg y Ala tienden que el péptido sea hipocolesterolémicos.

Según Mulero *et al.* (2011) el efecto hipocolesterolémico de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones:

Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, puede ser por la represión de la solubilidad micelar del colesterol, debido a que el colesterol necesita ser primero solubilizado en forma de micelas constituidas por ácidos biliares y otros lípidos para su absorción intestinal, se ha sugerido que los péptidos hipocolesterolémicos pueden competir con el colesterol por un sitio en dichas micelas reduciendo de esta forma la solubilidad del colesterol, su absorción intestinal y por ende los niveles de colesterol plasmático (Herrera *et al.* 2014).

Algunos péptidos pueden regular el alza de los receptores C-LDL, que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta (Mulero *et al.* 2011).

## **2.5. ESTRÉS OXIDATIVO**

### **2.5.1. PROBLEMA DE SALUD**

El oxígeno es esencial para los organismos aeróbicos para los diferentes procesos metabólicos que realiza, uno de ellos es la respiración; sin embargo, consecuencia de dicho proceso se generan de manera natural especies reactivas del oxígeno (ERO) y dentro de ellos los radicales libres (RL) como el superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo (OH) (García 2008, Soares de Castro y Sato 2015). Las ERO son moléculas inestables que están en continua formación en los seres vivos como resultado de los procesos metabólicos normales y son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo (Vioque y Millan 2005, Garcia 2008). Sin embargo, un exceso de las ERO generan el estrés oxidativo que se debe al desequilibrio entre la producción de las ERO y la eficacia del sistema de defensa antioxidante, ya sea por un agotamiento de compuestos antioxidantes endógenos y/o producción excesiva de ERO (Ben-Khaled *et al.* 2011, Ray *et al.* 2012).

El estrés oxidativo es un factor significativo responsable tanto del inicio como de la progresión de varias enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, aterosclerosis, diabetes, envejecimiento y cáncer, además, el estrés oxidativo se sugiere actualmente como un mecanismo subyacente de la hipercolesterolemia. Esto se debe a que las ERO al ser inestables pueden reaccionar rápidamente con otros grupos de sustancias en el organismo como lípidos, proteínas y ADN causando así, daño celular y tisular (García 2008, Ben-Khaled *et al.* 2011, Malaguti *et al.* 2014, Soares de Castro y Sato 2015). Dada la estrecha relación entre el estrés oxidativo y las enfermedades, el control del primero parece ser uno de los pasos cruciales para controlar el progreso de estas enfermedades o prevenir sus complicaciones.

### **2.5.2. CAUSAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

Las ERO nunca son totalmente eliminadas, ya que se producen continuamente debido a que tienen una función fisiológica en el organismo como la participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis (Venereo 2002). Sin embargo, existen factores exógenos como la contaminación, exceso de exposición solar, ejercicio muy intenso, malos hábitos alimenticios, estrés, consumo de tabaco y alcohol y ciertos medicamentos que producen un desequilibrio en el número de ERO incrementándolos y un exceso de éstos puede dar lugar a un daño celular o al desarrollo de enfermedades (Lobo *et al.*, citado por Beltrán 2010, Mulero *et al.* 2011). En condiciones hiperlipidémicas, tanto los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos como no enzimáticos, se alteran conduciendo a un daño mediado por ERO, siendo el estrés oxidativo un evento temprano en la evolución de la hiperlipidemia e hipercolesterolemia (Rony *et al.* 2014).

### **2.5.3. MECANISMO DE REGULACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL OXÍGENO (ERO)**

En el organismo existen varios sistemas de defensa desarrollados por la célula para protegerse contra los ERO como agente antioxidante no enzimático (ácido ascórbico y glutatión) y las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx)), capaces de neutralizar los ERO (Beltrán 2010).

Los antioxidantes endógenos pueden clasificarse en antioxidantes primarios y secundarios. La defensa antioxidante primaria está conformada por la SOD, la CAT y la GPx, las cuales inactivan las ERO en intermediarios. (Ben-Khaled *et al.* 2011, Noori 2012). La SOD (E.C. 1.15.1.1) cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa. Existen distintas formas dependiendo del metal del centro catalítico: Cu/Zn-SOD citosólica y extracelular, y la Mn-SOD mitocondrial. Mientras que la CAT (E.C. 1.11.1.6) es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua. Por último, está la GPx (E.C. 1.11.1.9), que también contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero a diferencia de la CAT, que usa el peróxido de hidrógeno como dador de electrones, utiliza el glutatión reducido. Existen dos formas: selenio dependiente y selenio independiente (Pérez y Pérez 2002, Paredes y Roca 2002). Las enzimas antioxidantes secundarias son el glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión-S-transferasa y la ubiquinona que trabajan directamente para desintoxicar los ERO mediante la disminución del nivel de peróxidos y suministrando continuamente NADPH y glutatión para las enzimas antioxidantes primarias para mantener su correcto funcionamiento (Vertuani *et al.*, citado por Noori 2012).

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas que tienen como función capturar ERO y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al ERO con el objetivo de estabilizarlo. El sistema de defensa antioxidante no enzimático está conformada por: vitamina C, la cual se encuentra en la forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo y algunos hidroperóxidos lipídicos, además de actuar sobre el tocoferoxilo, transformándolo a vitamina E. Sin embargo, el ascorbato puede llegar a ser un potente prooxidante cuando se encuentran presentes excesivas concentraciones de iones hierro y cobre. El Glutatión es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y es considerado el compuesto tiólico de bajo peso molecular que actúa sobre el peróxido de hidrógeno, superóxido y el radical hidroxilo (Corrales y Muñoz 2012).

Si la generación de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) es mayor a la capacidad del sistema de defensa antioxidante se genera un estrés oxidativo, en esta situación se requiere de antioxidantes de una fuente exógena (Ben-Khaled *et al.* 2011).

## **2.5.4. ANTIOXIDANTES EXÓGENOS**

### **a. MEDICAMENTOS**

Existen antioxidantes sintéticos que ya se han comenzado a emplear en medicina, entre ellos cabe destacar la N-acetilcisteína, el dimetilsulfóxido (DMSO), la etildimetiltiourea y el etanol. Los tres últimos poseen actividad antioxidante y pueden neutralizar el efecto del pernicioso radical hidroxilo (-OH) (Paredes y Roca 2002). Por otro lado, las estatinas desempeñan un papel importante en la arteriosclerosis actuando como un antioxidante para prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad durante condiciones de estrés oxidativo (Chegwin *et al.* 2012).

### **b. PÉPTIDOS BIOACTIVOS ANTIOXIDANTES**

Los alimentos pueden ser capaces de contrarrestar el estrés oxidativo, recientemente se ha incrementado la evidencia que sugiere que algunos péptidos pueden ejercer un efecto antioxidante proporcionando beneficios adicionales a las estrategias de defensa endógenas en la batalla contra el estrés oxidativo (Erdmann *et al.* 2008, Segura-Campos *et al.* 2013, Malaguti *et al.* 2014).

El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan dicha actividad como el hidrolizado de albumina de huevo, yema de huevo, pescado, caseína, suero lácteo, entre otros (Beltrán 2010, Mulero *et al.* 2011). Así como también proteínas de origen vegetal como el garbanzo, soya, girasol, entre otros (Hernández-Lesdema *et al.* 2005).

A pesar de que los mecanismos de acción de los antioxidantes provenientes de péptidos bioactivos no están entendidos por completo, se sabe que estos inhiben la peroxidación de lípidos, remueven radicales libres, quelan iones metálicos, eliminan especies reactivas de oxígeno o inhiben/activen ciertas enzimas pro o antioxidativas (Ajibola *et al.* 2013). Por otro lado, You *et al.* (2011) mencionan que los antioxidantes exógenos pueden promover o interactuar con antioxidantes endógenos para formar una red cooperativa de antioxidantes.

Las propiedades antioxidantes de los péptidos bioactivos dependen de su composición, estructura e hidrofobicidad. No solo con la presencia de aminoácidos se determina la actividad antioxidante sino también la secuencia de estos en la cadena peptídica, siendo este último factor determinante en el poder antioxidante (Ajibola *et al.* 2013). Por otro lado,

Beltrán (2010) indica que el tamaño de los péptidos liberados en la hidrólisis está relacionado a la actividad antioxidante, siendo los hidrolizados de menor tamaño los que presentan un efecto mayor (Acevedo *et al.* 2013). Asimismo, Erdmann *et al.* (2008) indican que el efecto antioxidante de ciertos aminoácidos es mayor cuando se incorporan en dipéptidos.

Soares de Castro y Sato (2015) indican que la presencia de Tyr, Trp, Met, Lys y Cys representan un importante factor en la actividad antioxidante de los péptidos, especialmente por su capacidad de reducir al  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y por quelar iones de  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ . Respecto a los aminoácidos hidrofóbicos, mencionan que son importantes para la mejora de las propiedades antioxidantes debido a que pueden incrementar la accesibilidad de los péptidos antioxidantes hacia dianas celulares hidrofóbicas. Por otra parte, Navam *et al.* (2011) mencionan que algunos de los factores que podrían afectar la actividad antioxidante son: la especificidad de la proteasa usada en la hidrólisis, el grado de hidrólisis y las propiedades estructurales de los péptidos resultantes, incluyendo el tamaño molecular, la hidrofobicidad y la composición de aminoácidos. Además, la presencia y cantidad de His, Cys, Pro Met y aminoácidos aromáticos ha sido reportada como contribuyente de dicha actividad en los péptidos alimenticios, así como la presencia de un residuo de Leu o Pro al extremo N de un dipéptido (Hartmann y Meisel 2007, Korhonen y Pihlanto 2006).

## **2.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA CARACTERIZAR PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Existen diferentes modelos biológicos que se pueden emplear como bioensayos, de manera general se encuentran los estudios *in vitro* e *in vivo*.

### **2.6.1. ESTUDIO *in vitro***

Los estudios *in vitro* son una simplificación de una realidad mucho más compleja, el ser vivo, por eso en muchas ocasiones la información que son capaces de proporcionar es limitada y a menudo no tienen una completa correlación con los resultados obtenidos en el organismo como un todo (Beas *et al.* 2011). Aun así, no cabe ninguna duda de que ofrecen ventajas intrínsecas muy destacables para evaluar características esenciales de compuestos de origen natural con actividad biológica por ser relativamente simples, disponibilidad, bajo costo, fácil control de las variables experimentales, necesidad de cantidades muy pequeñas del compuesto en estudio y la posibilidad de realizar estudios en etapas muy tempranas del desarrollo de un nuevo fármaco o agente terapéutico, proporcionando una evaluación valiosa

sobre las sustancias que deberían ser descartadas o sujetas a caracterización posterior (Acevedo *et al.* 2013). El empleo de sistemas modelo *in vitro* pueden tener un efecto beneficioso considerable en la exploración de la estabilidad y actividad de secuencias peptídicas (Walsh *et al.* 2004).

### **2.6.2. ESTUDIO *in vivo***

Los experimentos *in vivo* son realizados en el ser vivo y son necesarios para demostrar los efectos fisiológicos de los péptidos, siendo los estudios *in vitro* una alternativa temprana para evaluar la funcionalidad de los mismos por estar basados en mecanismos biológicos. Sin embargo, es difícil establecer una relación directa entre la actividad biológica *in vitro* y el efecto *in vivo*, debido a que procesos tales como la digestión pueden modificar la actividad del péptido convirtiendo un péptido bioactivo aparente en uno inactivo y viceversa. Es por ello que la biodisponibilidad de los péptidos después de su administración oral juega un papel importante (Segura *et al.* 2010). Los estudios en animales y ensayos clínicos aleatorios serán necesarios en el futuro para determinar completamente los efectos protectores/preventivos de los péptidos bioactivos, ya que los modelos *in vivo* determinan la utilidad y eficacia en el individuo, considerando además la actividad selectiva o específica sobre los órganos o sistemas fisiológicos (Galicía *et al.* 2013, Malaguti *et al.* 2014). Para los modelos *in vivo* se emplean animales de laboratorio.

### **2.6.3. MODELO ANIMAL RATA**

Un modelo animal es una especie animal que se estudia de forma exhaustiva en el laboratorio para comprender un fenómeno biológico concreto con el objetivo de que los hallazgos en esta especie sirvan para explicar cómo funciona este mismo proceso en otros seres vivos, generalmente en los humanos (Navarro *et al.* 2012). Los modelos animales más empleados en el laboratorio son los ratones, ratas, cobayos y hámsteres por su pequeño tamaño, corta vida, facilidad de manejo y alta tasa de reproducción. Siendo la rata el segundo animal requerido en la mayoría de experiencias *in vivo*, después del ratón. Además, es utilizado en investigaciones nutricionales, comportamentales y endocrinológicas, debido a que al igual que el ratón, presentan muchas características biológicas en común con los humanos (Silvia 2006, Navarro *et al.* 2012). En el Cuadro 3 se puede observar el empleo de la rata en diversos estudios *in vivo* para la evaluación de la actividad biológica de péptidos obtenidos de alimentos.

**Cuadro 3: Estudios *in vivo* empleando modelo rata para diversos estudios de actividad biológica de péptidos**

Fuente proteica	Enzima hidrólisis	Secuencia peptídica	Estudio fisiológico	Resultado	Referencia
Corvina	Pepsina, tripsina y $\alpha$ -quimiotripsina	HNGCFTK	Actividad antioxidante	↑enzimas antioxidantes (CAT, GSH, SOD)*	Nazeer <i>et al.</i> (2012)
Leche	Tripsina	-	Actividad antioxidante	↑enzimas antioxidantes (SOD,GPx, CAT)*	Awad <i>et al.</i> (2016)
Soya	Alcalasa	Péptidos de bajo peso molecular	Actividad antihipertensiva	↓38 mm Hg (100 mg/kg)	Wu y Ding (2001)
Pollo	Termolisina	IKW	Actividad antihipertensiva	↓50 mm Hg (10 mg/kg)	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Leche	Pepsina	YQKFPQY	Actividad antihipertensiva	↓15.0 mm Hg (5 mg/kg)	Ruiz-Giménez <i>et al.</i> (2010)
Sardina	<i>B.pumilus</i> A1, <i>B. mojavensis</i> A21 y viscera de sardina	-	Actividad hipocolesterolemica	↓ nivel CT, TT, C-LDL*	Ben-Khaled <i>et al.</i> (2012)

\*CAT: Catalasa, GSH: Glutacion, SOD: Superóxido dismutasa, GPx: Glutacion peroxidasa, CT: Colesterol total, TT: Triglicéridos totales, C-LDL: Colesterol-LDL.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se desarrolló en las siguientes locaciones:

- Laboratorio de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).
- Laboratorio de Análisis Biológico Bioterio de la Facultad de Zootecnia de la UNALM.
- Laboratorio de Bioquímica Nutricional de la UNALM.
- Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

- La variedad “cupis” de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) proveniente de la estación agronómica experimental INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) de Puno, Perú.
- Las enzimas que se emplearon fueron neutrasa® 5.0 BG (UA/g) y alcalasa ® 2.4 L (UA/g) (Novo Nordisk, Dinamarca).
- Dieta estándar para ratas elaborada por la Planta piloto de alimentos balanceados de la UNALM.
- El medicamento que se empleó para el tratamiento antihipertensivo fue el captopril (Sigma Aldrich, USA) y para el tratamiento hipocolesterolémico y antioxidante fue la atorvastatina 40 mg (Alkast, India).

#### **3.3. MODELO ANIMAL**

- Ratas albinas machos Holtzman (*Rattus norvegicus* Holtzman), con un peso promedio de  $180 \pm 20$  g procedentes del Laboratorio de Análisis Biológico Bioterio de la Facultad de Zootecnia de la UNALM (Lima, Perú).

### **3.4. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

#### **3.4.1. MATERIALES**

- Cánula 17G
- Columna analítica de fase reversa (RP) para cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) Kinetex C<sub>18</sub> (2.1 mm x 30 mm)
- Jaulas individuales con bebedero y comedero
- Materiales de vidrio diversos: Termómetro, embudo Büchner, beakers, matraces, fioles, pipetas, cubetas de vidrio, etc.
- Materiales de plástico diversos: tubos colectores de 2 mL, 15 mL y 50 mL, tips, jeringas de 1 mL, placa multipozo, botellas ámbar etc.
- Micropipetas (0.5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL y 0.5-5 mL).
- Tubos colectores de suero (BD Vacutainer, Becton Dickinson and Company, EE.UU)

#### **3.4.2. EQUIPOS**

- Agitador magnético (modelo M6, Cat, Alemania)
- Agitador Vortex (modelo F202A0175, VELP scientific, Europa)
- Balanza analítica (modelo AR2140, OHAUS, USA)
- Balanza de precisión (modelo Scout, OHAUS, China)
- Baño maría con agitación (modelo 1083, GFL, Alemania)
- Bomba de vacío (modelo ME2C, Vacuumbrand, Alemania)
- Centrífuga refrigerada (modelo Rotofix 32, Hettich, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingesa, Perú)
- Congelador (modelo H300, Electrolux, Brasil)
- Cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) (modelo ACQUITY UPLC H-Class, Waters Associates®, Irlanda) con detector de arreglo de diodos (modelo ACQUITY UPLC H-Class, Waters Associates®, Irlanda)
- Equipo medidor de presión arterial incruenta no invasiva en rata (modelos LE 5001, Panlab, España)
- Espectrofotómetro UV/Vis (modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific, USA)
- Liofilizador (modelo Freezone Benchtop, Labconco, USA)
- Molino (modelo Pulverisette 14, Fritsch, Alemania)

- Potenciómetro digital (modelo 410, Thermo Orion, USA)
- Refrigerador (modelo GR-482BEF, LG, Corea)

### 3.4.3. REACTIVOS

- 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma Aldrich, USA)
- 2,4,6-Ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) (Sigma Aldrich, USA)
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (Sigma Aldrich, India)
- Acetonitrilo (Fermont, México)
- Ácido clorhídrico 37% (J.T. Baker, México)
- Ácido cólico (Merck, Alemania)
- Ácido hipúrico 98% (Sigma Aldrich, India)
- Ácido picrilsulfónico 5% (Sigma Aldrich, India)
- Ácido trifluoroacético (Merck, Alemania)
- Albumina de suero bovino (ASB) (Sigma Aldrich, USA)
- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de potasio (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de sodio cristal (J.T. Baker, USA)
- Colesterol 92.5% (Merck, Alemania)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich, USA)
- Éter de petróleo (J.T. Baker, USA)
- Enzima convertidora de angiotensina - I (ECA) (Sigma Aldrich, USA)
- Folin-Ciocalteau (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck, Alemania)
- Hidróxido de sodio en perlas (J.T. Baker, México)
- Kit enzimático de determinación de superóxido dismutasa (SOD) (Sigma Aldrich, USA)
- Kit enzimático de determinación de colesterol total (Valtek diagnostics, Chile)
- Kit enzimático de determinación de triglicéridos totales (Valtek diagnostics, Chile)
- Kit enzimático de determinación de colesterol-HDL (Valtek diagnostics, Chile)
- Kit enzimático de determinación de colesterol-LDL (Valtek diagnostics, Chile)

- L- leucina 99% (Sigma Aldrich, USA)
- L-NG- nitroarginina metil éster (L-NAME) (Sigma Aldrich, USA)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratado 98% (Sigma Aldrich, India)
- Solución salina al 0.9% de cloruro de sodio (B. Braun, España)
- Sulfato de cobre pentahidratado (Sigma Aldrich, USA)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99% (Sigma Aldrich, USA)

### **3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.5.1. HUMEDAD**

El contenido de humedad se determinó por el método 930.15 (AOAC 2007), que se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta masa constante en estufa al vacío. Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **3.5.2. PROTEÍNA TOTAL**

La determinación de proteínas total se realizó por el método 920.87 (AOAC 2007), que se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, este producto se destila recibiendo en ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo. El contenido de nitrógeno total se convirtió a contenido de proteína al multiplicarse por el factor 5.85 empleado en el caso de cereales (Schoenlechner *et al.* 2008). Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **3.5.3. PROTEÍNA SOLUBLE**

El contenido de proteína soluble fue determinado según la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951), que se basa en que ciertos amonioácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría a 650 nm. La cantidad de proteínas en la muestra se estimó a partir de una curva estándar de una solución proteica estándar de Albúmina Sérica Bovina (ASB) en un rango de concentración de 0.5–3 mg/mL (Anexo 1). Los resultados se expresaron en mg de ASB/mL.

Este análisis se realizó mezclando 400  $\mu\text{L}$  de la muestra hidrolizada diluida en solución salina al 0.9 por ciento con 2 mL del reactivo C (mezcla de reactivo A:B1:B2 en proporciones de 100:1:1), siendo el reactivo A una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 por ciento en 0.1 M de NaOH, el reactivo B1 una solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  al 0.5 por ciento en agua destilada y el reactivo B2 una solución de tartrato de sodio al 1 por ciento en agua destilada. Después de 10 minutos a la mezcla se le añadió 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin Ciocalteau 1 N y el conjunto se agitó e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

#### 3.5.4. GRADO DE HIDRÓLISIS

Se determinó mediante el método reportado por Adler–Nissen (1979) con ligeras modificaciones, basado en la determinación de los grupos amino libres con ácido 2,4,6-trinitrobenzenilsulfónico (TNBS). Las aminas primarias, al reaccionar con el TNBS forman un cromógeno que puede ser medido a 340 nm. Los valores de grado de hidrólisis (DH) se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{DH (\%)} = 100 \left( \frac{\text{AN}_2 - \text{AN}_1}{\text{Npb}} \right)$$

Donde:

DH: Grado de hidrólisis

$\text{AN}_1$ : Nitrógeno amínico en la proteína antes de la hidrólisis, esto es la muestra tomada antes de agregar la enzima, considerada como el tiempo cero (mg/g de proteína).

$\text{AN}_2$  es el nitrógeno amínico en la proteína después de la hidrólisis (mg/g de proteína)

Npb es el contenido de nitrógeno amínico de los enlaces peptídicos en el sustrato (concentrado proteico), el cual se determinará después de la hidrólisis total con HPCl 6 M a 110 °C por 24 horas seguido de una filtración en papel Whatman N° 40 y posterior neutralización con NaOH 2 M.

El análisis se realizó en un tubo de ensayo donde se agregó 0.5 mL de buffer borato 0.2 M (pH 8.3), 0.063 mL de la muestra proteica hidrolizada disuelta en SDS al 1 por ciento y 0.5 mL de una solución de ácido picrilsulfónico (TNBS, 1 mg/mL). El conjunto se incubó a 50 °C durante 60 minutos en un baño María (en oscuridad) con agitación. La reacción se detuvo agregando 1 mL de HPCl 0.1 N y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20

minutos. Luego se agregó 2 mL de agua destilada y se dejó reposar por 10 minutos más. Los resultados se determinaron con la ayuda de una curva estándar utilizando una solución de L-leucina en SDS al 1 por ciento en un rango de concentración de 0.5–3.0 mM (Anexo 1). Se preparó un blanco sustituyendo la muestra por 0.063 mL de solución de SDS al 1 por ciento en agua destilada. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 340 nm.

### **3.5.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS (2,2'-AZINO-BIS (3-ETHYLBENZOTIAZOLINA-6-SULFONÓICO))**

Se empleó el método reportado por Torruco *et al.* (2009) y Re *et al.* (1999) adaptado para hidrolizados proteicos, que se basa en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etil benzotiazolina-6-sulfónico) con persulfato de potasio. La actividad antioxidante se estimó a partir de una curva estándar empleando una solución de Trolox en un rango de concentración de 0.5–2.0 mM (Anexo 1). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalente (TE)/g de muestra.

Este ensayo se realizó preparando la solución A: 7 mM de ABTS y la solución B: 25.4 mM de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, ambas diluidas en agua desionizada. Estas fueron mezcladas en una proporción de 9:1 y se almacenaron por 12-16 horas en oscuridad antes de su uso. A esta solución se le denominó solución madre. Luego del tiempo transcurrido, se preparó la solución diluida de ABTS<sup>•+</sup> buffer fosfato salino (PBS), la cual consiste en: 8.18 g/L de NaCl, 0.27 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.42 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 0.15 g/L de KCl disueltos en agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7.4 (usando NaOH 1M). Luego, la solución diluida de ABTS y el PBS se mezclaron en una proporción 1:50 respectivamente, hasta alcanzar una absorbancia de 0.70±0.03 a 734 nm. Para la medición de la actividad antioxidante se empleó 40  $\mu\text{L}$  de la muestra hidrolizada previamente diluida en PBS y se mezcló con 4 mL de la solución diluida de ABTS. Después de una hora de reacción (en oscuridad) se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Asimismo, para la lectura del blanco se usó PBS en lugar de muestra y se determinó:

$$\Delta\text{ABTS} = \text{Lectura de blanco} - \text{Lectura de muestra}$$

### 3.5.6. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Se determinó empleando la metodología de Wu *et al.* (2002) modificado por Barbana y Boye (2011). Se empleó el sustrato hipuril-histidilleucina (HHL) 2.17 mM en una solución de buffer borato salino (BBS) conteniendo buffer borato 0.2 M a pH 8.3 con 300 mM de NaCl. La ECA que contenía 1 unidad (U) fue disuelta en 0.5 mL de BBS y se usó 2 mU (10  $\mu$ L) de enzima. El ácido hipúrico (AH) se preparó a partir de una solución madre cuya concentración fue de 10 mM preparada en BBS, esta solución se usó para la diferenciación de picos cromatográficos entre el AH y HHL, trabajando a concentraciones de 0.15 y 0.54 mM respectivamente. El volumen total de la reacción fue de 70  $\mu$ L, de los cuales 50  $\mu$ L estuvieron conformados por 2.17 mM de HHL, 10  $\mu$ L de 2 mU de ECA y 10  $\mu$ L de los diferentes hidrolizados (diluídos a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mg/mL en BBS). La reacción se llevó a cabo en tubos colectores de 250  $\mu$ L bajo agitación constante durante 30 min a 37 °C en baño maría.

La reacción se detuvo con la adición de 85  $\mu$ L de HPCl 1N. Terminando la reacción, las muestras fueron filtradas empleando filtros Millipore de 0.22  $\mu$ L y se inyectó 10  $\mu$ L de la muestra filtrada al UPLC. La separación en el UPLC se realizó utilizando como fase móvil dos solventes en un gradiente del solvente A (agua con 0.05 por ciento de ácido trifluoroacetico (TFA)) y el solvente B (acetonitrilo con 0.05 por ciento de TFA). La corrida se realizó a 40 °C bajo un flujo de 1 mL/min. La detección y cuantificación se realizó empleando el detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 229 nm. La actividad inhibitoria de la ECA fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria ECA (\%)} = \frac{(Ac - As)}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Donde:

Ac: Concentración de AH en el control

As: Concentración de AH en la muestra

Ab: Concentración de AH en el blanco

### 3.5.7. IC<sub>50</sub>

El IC<sub>50</sub> se calculó como la concentración de hidrolizado que permite una inhibición del 50 por ciento de la actividad inhibitoria de la ECA expresada en mg proteína/mL. Se utilizó el método de Asoodeh *et al.* (2012). Se evaluaron concentraciones de hidrolizado en un rango

de 0.05 a 0.5 mg/mL Este valor se determinó mediante un análisis de regresión de la inhibición de la ECA (porcentaje) frente al logaritmo de la concentración de péptidos (mg proteína/mL).

### **3.5.8. PRESIÓN ARTERIAL NO INVASIVA**

La medición de la presión arterial se llevó a cabo mediante el uso de un equipo de medición de presión arterial incruenta de manera no invasiva (NIBP) - LE 5001 similar a lo realizado por García *et al.* (2014), que contiene un microprocesador o transductor infrarrojo para captar indirectamente valores de presión arterial en la cola de la rata, registrando valores de presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD). Para dichas mediciones se basó en el protocolo NIBP para ratas (Anexo 2), para lo cual en la mañana de cada día de medición, las ratas se inmovilizaron en una cabina y en un ambiente a 32 °C durante 15 minutos con la finalidad de provocar la vasodilatación de la cola y poder detectar la pulsación de la arteria. Posterior a ello, se conectó el transductor y el esfigmomanómetro en la cuarta parte y mitad desde el final de la cola del animal (Anexo 3), respectivamente para realizar las mediciones de PAS y PAD, los cuales fueron expresados en mm Hg. Se registraron al menos cinco lecturas, de los cuales se descartaron los valores máximos y mínimos, y se calculó la presión promedio de los tres valores restantes.

### **3.5.9. PERFIL LIPÍDICO**

La determinación del perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos totales, colesterol-HDL, colesterol-LDL y colesterol-VLDL) en el suero se realizó empleando kits enzimáticos comerciales. Los valores fueron expresados en mg/dL de suero.

Para la determinación de colesterol total se mezcló 0.01 mL de suero con 1 mL de reactivo enzimático e incubó a 37 °C durante 5 minutos. Asimismo, se realizó el calibrador que tuvo 0.01 mL de calibrador y 1 mL de reactivo enzimático de trabajo y el blanco que tuvo 1 mL de reactivo enzimático de trabajo. Luego se realizó la lectura de absorbancia a 505 nm por espectrofotometría previamente llevando la absorbancia a cero con el blanco. Los valores de colesterol total fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol total (mg/dL)} = \frac{\text{Concentración Calibrador}}{\text{Absorbancia Calibrador}} \times \text{Absorbancia Muestra}$$

En el caso de la cuantificación de los triglicéridos totales se mezcló 0.01 mL de suero con 1 mL de reactivo de trabajo para triglicéridos e incubó a 37 °C durante 5 minutos. Asimismo, se realizó un calibrador que tuvo 0.01 mL de calibrador y 1 mL de reactivo enzimático de trabajo y el blanco solo 1 mL de dicho reactivo. Luego de ello se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm por espectrofotometría. Los valores de triglicéridos totales fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Triglicéridos totales (mg/dL)} = \frac{\text{Concentración Calibrador}}{\text{Absorbancia Calibrador}} \times \text{Absorbancia Muestra}$$

El colesterol-HDL se determinó con 0.01 mL de sobrenadante de la centrifugación de 0.2 mL de suero con 0.5 mL de reactivo precipitante a 2648 g por 15 minutos a temperatura ambiente y 1 mL de reactivo colesterol, la mezcla del sobrenadante y reactivo colesterol se incubó a 37 °C por 10 minutos. Asimismo, se realizó el estándar con 0.01 mL de estándar y 1 mL de reactivo colesterol y un blanco con 1 mL de reactivo colesterol y 0.01 mL de agua destilada. Se realizó la lectura la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro previamente llevando la absorbancia a cero con el blanco. Los valores de colesterol-HDL fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol-HDL } \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{76.5}{\text{Absorbancia estandar}} \times \text{Absorbancia Muestra}$$

Para la determinación de colesterol-LDL se centrifugó 0.05 mL de suero y 0.5 mL de reactivo precipitante a 2648 g por 15 minutos a temperatura ambiente y se extrajo 0.1 mL del sobrenadante, el cual se hizo reaccionar con 1 mL de reactivo colesterol incubando por 10 minutos a 37 °C. Asimismo, se realizó el estándar con 0.01 mL de estándar y 1 mL de reactivo enzimático colesterol, y el blanco con 0.01 mL de agua destilada y 1 mL de dicho reactivo. Se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 505 nm previamente llevando la absorbancia a cero con el blanco. Los valores de colesterol-LDL fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol-LDL } \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \text{Colesterol Total} - \frac{240}{\text{Absorbancia estandar}} \times \text{Absorbancia Muestra}$$

La cuantificación de colesterol-VLDL se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol-VLDL } \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Triglicéridos totales}}{5}$$

### 3.5.10. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

Se determinó la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) basado en el método usado por Benomar *et al.* (2015) empleando el kit de determinación de SOD, el cual se basa en la generación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) producida por la conversión de la xantina a ácido úrico y peróxido de hidrógeno debido a la enzima xantina oxidasa (XO), el  $O_2^-$  se oxida a  $O_2$  y reduce la sal de tetrazolio de Dojindo (WST-1: sal monosódica 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) a cristales de formazán solubles en agua (WST-1 formazán), el cual se puede medir mediante método colorimétrico a través de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. La SOD cataliza la dismutación de los  $O_2^-$  formados de la conversión de xantina a ácido úrico en oxígeno y peróxido de hidrógeno reduciendo la concentración del anión superóxido, generando una menor formación de WST-1 formazán. Dado que la absorbancia a 450 nm es proporcional a la cantidad de anión superóxido, la actividad de SOD como actividad de inhibición se puede cuantificar midiendo la disminución en el desarrollo del color.

Se preparó en placas multipozos, el ensayo, blanco 1, blanco 2 y blanco 3, según la secuencia descrita en el Cuadro 4, se agregó 20  $\mu$ L de solución muestra a cada ensayo y al blanco 2 y, 20  $\mu$ L de agua Milli-Q al blanco 1 y 3. Seguido a ello se añadió a todos 200  $\mu$ L de solución de trabajo WST-1 (1 mL de solución WST con 19 mL de solución tampón). Por último, se adicionó 20  $\mu$ L de solución de trabajo enzimático (15  $\mu$ L de solución de enzima con 2.5 mL de solución de tampón) al ensayo y blanco 1 mientras que 20  $\mu$ L de solución tampón al blanco 2 y 3. Se incubó las placas a 37 °C durante 20 minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm.

**Cuadro 4: Cantidad de cada solución para la muestra y blanco 1, 2 y 3**

Componente	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Solución de muestra	20 $\mu$ L		20 $\mu$ L	
Milli-Q		20 $\mu$ L		20 $\mu$ L
Solución de trabajo WST-1	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Buffer de solución			20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Solución de trabajo enzimático XO	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L		

Una unidad (U) es la cantidad de SOD que inhibe la reducción del WST-1 al 50 por ciento. La actividad específica de SOD es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína de suero, se expresó como U/mg de proteína del suero de la rata y se calculó usando las siguientes ecuaciones.

$$\text{Inhibición de SOD (\%)} = \frac{\{[(\text{Ablanco 1}-\text{Ablanco 3})-(\text{Amuestra}-\text{Ablanco2})]\}}{(\text{Ablanco 1}-\text{Ablanco 3})} \times 100$$

$$\text{Actividad específica SOD (U/mg)} = \frac{\% \text{Inhibición}}{50 * \text{Solución enzimática (mL)} * \text{Conc. proteína} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \times 10$$

### 3.6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.6.1. OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA

El hidrolizado proteico de cañihua se obtuvo a partir del grano de la cañihua, el cual se sometió a la extracción de la proteína y posteriormente hidrolisis enzimática, se siguió la metodología propuesta por Fritz *et al.* (2011) para la extracción de proteína y Espinoza (2014) para la hidrolisis enzimática, con ligeras modificaciones.

##### a. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

- **Limpieza:** Se retiró todo material extraño como hojas, piedras, pajas, etc.
- **Molienda/ Tamizado:** El grano de cañihua se molió en un molino de laboratorio, del cual se obtuvo un producto de tamaño menor a 500  $\mu\text{m}$ , denominado harina de cañihua.
- **Desgrasado:** Se mezcló la harina con éter de petróleo en una relación de 1:3, bajo agitación durante 16 horas a temperatura de refrigeración (4 °C). Luego se filtró y eliminó el solvente residual de la torta mediante secado en estufa a una temperatura de 45 °C por 30 minutos.
- **Extracción alcalina:** La extracción de proteína se realizó con una relación materia prima y solvente 1:20, pH 9.5 (usando NaOH 1 N), 32 °C y un tiempo de 20 minutos en un baño maría con agitación.

- **Centrifugación:** Luego de la extracción alcalina se centrifugó la solución a 21188 g por 10 minutos a temperatura de 10 °C, conservándose el sobrenadante. Se realizó una segunda extracción a la torta obtenida, bajo las mismas condiciones.
- **Filtración:** Los sobrenadantes de ambas extracciones fueron filtrados con bomba de vacío usando papel Whatman N° 1.
- **Precipitación isoelectrica:** Se ajustó el pH a 4.8 (usando HPCl 1N), bajo agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- **Centrifugación:** Se centrifugó a 21188 g por 20 minutos a una temperatura de 5 °C y se descartó el sobrenadante.
- **Lavado:** Al precipitado se le realizó dos lavados con agua destilada en una relación concentrado y solvente de 1:10 y se procedió a repetir la operación de centrifugación, recuperándose el precipitado.
- **Neutralización:** El precipitado se resuspendió en agua destilada suficiente para poder regular el pH entre 6.8–7 con NaOH 0.1 N.
- **Liofilización:** Se procedió a secar por liofilización y se almacenó en congelación (-20 °C) en bolsas de polietileno a para su posterior hidrólisis.

#### **b. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Se empleó las enzimas de grado alimentario neutrasa® (endopeptidasa y exopeptidasa) a una concentración de 0.385 AU/g de proteína, a un pH inicial de 7 y temperatura de 50 °C y alcalasa® (endopeptidasa) a una concentración de 0.385 AU/g de proteína, a un pH inicial de 8.3 y temperatura de 50 °C.

- **Hidrólisis enzimática:** La reacción se realizó en erlenmeyers de 250 mL, conteniendo inicialmente 85 mL de solución a una concentración de 2.5 por ciento de proteína disuelta en agua Milli-Q. La hidrólisis proteica inició con la adición de la enzima neutrasa a un pH 7 durante 120 minutos, bajo agitación constante y a temperatura controlada. Seguido a ello se ajustó nuevamente el pH a 8.3 con NaOH 2 M y se completó el volumen hasta 100 mL con agua desionizada, se agregó la enzima alcalasa y siguió la hidrólisis durante 60 minutos. La reacción fue detenida por inactivación térmica a 100 °C durante 10 minutos.
- **Centrifugación:** Se centrifugó a 16270 g durante 10 minutos, recuperándose el sobrenadante (conteniendo los péptidos).

- **Neutralización:** El sobrenadante se reguló a pH 6.8-7 con NaOH 2 M.
- **Encapsulado:** Se adicionó maltodextrina al 2 por ciento respecto a los sólidos totales determinados por los grados Brix. El encapsulante se disolvió en 50 mL de agua desionizada a temperatura de 40 °C y se agregó gota a gota al hidrolizado que permaneció en constante agitación.
- **Liofilización:** El hidrolizado se secó por liofilización y se almacenó en bolsas de polietileno en congelación (-20 °C).

Al hidrolizado proteico de cañihua (HPC) se le determinó el contenido de proteína total, humedad y grado de hidrólisis.

### **3.6.2. EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE**

La evaluación *in vitro* del HPC consistió en la determinación de la actividad antioxidante por medio del método ABTS, la actividad antihipertensiva (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina-I, ECA) (%) y el valor IC<sub>50</sub> (mg/mL).

### **3.6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental que se siguió se presenta en la Figura 3. La evaluación *in vivo* del efecto antihipertensivo, hipocolesterolémico y antioxidante del HPC se realizó en tres etapas que se detallan a continuación:

#### **a. ACONDICIONAMIENTO**

En esta etapa se empleó como base estudios de Rony *et al.* (2014), Awad *et al.* (2016), Ali *et al.* (2016) y Huang *et al.* (2011), para lo cual se procedió a escoger al azar un grupo de 28 ratas machos Holtzmann de 180 ± 20 g de peso provenientes del Bioterio de la Facultad de Zootecnia de la UNALM tratando que los animales presenten homogeneidad tanto en peso, edad y salud, los cuales fueron subdivididas en 4 grupos de 7 ratas para el estudio de la actividad antihipertensiva. De la misma manera, para el estudio hipocolesterolémico y antioxidante se procedió a escoger al azar un grupo de 24 ratas machos de las mismas condiciones, los cuales fueron separados en 4 grupos de 6 ratas. Cada una de las ratas fue ubicada en una jaula individual alimentada con dieta estándar (DE) (Anexo 4) y agua *ad*

*libitum*, con un ciclo día/noche de 12 horas y temperatura de 22-26 °C durante siete días de adaptación.

## **b. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y ANTIOXIDANTE**

Se realizó en dos evaluaciones, la actividad biológica antihipertensiva y la actividad biológica hipocolesterolémica y antioxidante.

### **b.1. Actividad biológica antihipertensiva**

Los primeros cuatro grupos de ratas se emplearon para evaluar la actividad fisiológica antihipertensiva, para ello un grupo fue el control, el cual recibió 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl, a los demás grupos se les indujo la elevación de la presión arterial con L-NAME administrando 40 mg/kg peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl vía oral aproximadamente a las 2 pm, luego de dos horas se administró al grupo L-NAME + HPC una solución de 100 mg de hidrolizado proteico de cañihua/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl por vía oral y al grupo L-NAME + captopril se le administró una solución de captopril a una dosis de 10 mg/kg peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl vía oral, y a los grupos control y L-NAME, se administró 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl, como se observa en el Cuadro 5. Después de dos horas de la administración del captopril e hidrolizado proteico de cañihua se les proporcionó la alimentación (DE) y agua *ad libitum*. La administración del agente inductor (L-NAME) como del agente antihipertensivo (captopril) e hidrolizado proteico de cañihua (HPC) fue por medio de una cánula 17 G. La evaluación se realizó durante 30 días, como la propuesta de Nguelefack *et al.* (2009), Metchi *et al.* (2013) y Huang *et al.* (2011).

**Cuadro 5: Descripción de los grupos para el estudio antihipertensivo**

Tratamiento	Descripción	Referencia
Control	1 mL de solución salina al 0.9% de NaCl.	Hayes <i>et al.</i> (2016) García <i>et al.</i> (2014)
L-NAME	Agente inductor: Solución de 40 mg L-NAME/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9% NaCl.	Metchi <i>et al.</i> (2013) Ahrén <i>et al.</i> (2014) Nguelefack <i>et al.</i> (2009)
L-NAME + HPC	Agente inductor: Solución de 40 mg de L-NAME/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9% NaCl. Hidrolizado proteico de cañihua: Solución de 100 mg hidrolizado proteico de cañihua/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9% NaCl.	Huang <i>et al.</i> (2011) Lin <i>et al.</i> (2011)
L-NAME + Captopril	Agente inductor: Solución de 40 mg de L-NAME/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9% NaCl. Agente antihipertensivo: Solución de 10 mg de captopril/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9% NaCl.	Hayes <i>et al.</i> (2016) García <i>et al.</i> (2014) Lin <i>et al.</i> (2011)

### **b.2. Actividad biológica hipocolesterolémica y antioxidante**

Para el estudio de la actividad biológica hipocolesterolémica y antioxidante, el grupo control recibió 1 mL aceite vegetal de soya, los demás grupos fueron alimentados con el agente inductor administrando una dieta rica en colesterol (colesterol 1% y ácido cólico 0.1%, de la DE (20 g) disueltos en 1 mL de aceite de soya) vía oral aproximadamente a las 2 pm, luego de dos horas se administró al grupo HCD + HPC una solución de 100 mg de proteína del hidrolizado proteico de cañihua/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl por vía oral y al grupo HCD + atorvastatina se le administró una suspensión de atorvastatina previamente molida a una dosis de 2.5 mg/kg peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9 por ciento de NaCl vía oral, como se muestra en el Cuadro 6. Por último después de dos horas se les proporcionó alimentación (DE) y agua *ad libitum*. La administración de la dieta rica en colesterol como del agente hipocolesterolémico

(atorvastatina) e hidrolizado proteico de cañihua fue por medio de la cánula. El tiempo de evaluación fue de 35 días, como lo propone Hassimotto y Lajolo (2011).

**Cuadro 6: Descripción de los grupos para el estudio hipocolesterolemico y antioxidante**

Tratamiento	Descripción	Referencia
Control	1 mL de aceite vegetal de soya	Castro <i>et al.</i> (2003)
HCD	Agente inductor: Dieta rica en colesterol (1% de colesterol + 0.1% de ácido cólico, de la DE) en 1 mL de aceite vegetal de soya.	Antunez <i>et al.</i> (2008) Castro <i>et al.</i> (2003) Ben-Khaled <i>et al.</i> (2012)
HCD + HPC	Agente inductor: Dieta rica en colesterol (1% de colesterol y 0.1% de ácido cólico, de la DE) en 1 mL de aceite vegetal de soya. Hidrolizado proteico de cañihua: 100 mg de proteína del HPC/kg de peso corporal en 1 mL de solución salina al 0.9% de NaCl.	Huang <i>et al.</i> (2011)
HCD + atorvastatina	Agente inductor: Dieta rica en colesterol (1% de colesterol y 0.1% de ácido cólico, de la DE) en 1 mL de aceite vegetal de soya. Agente hipocolesterolémico: atorvastatina (2.5 mg/kg de peso corporal) en 1 mL de solución salina al 0.9% de NaCl.	Rony <i>et al.</i> (2014)

### 3.6.4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y ANTIOXIDANTE

Para la actividad antihipertensiva se realizó la medición de la presión arterial (PAS y PAD) en la cola de la rata antes de iniciar la evaluación (0 día) y cada seis días durante toda la evaluación similar a lo realizado por Huang *et al.* (2011) y Nguelefack *et al.* (2009). Para ello se empleó un equipo de medición de presión arterial incruenta (NIBP) y se siguió el protocolo NIBP descrito en el 3.5.8.

La actividad hipocolesterolémica se analizó al finalizar el tiempo de evaluación, los animales fueron anestesiados con éter etílico como lo propuesto por Heeba y Abd-Elghany (2010) y

una vez inconscientes se procedió a la recolección de muestras de sangre del corazón por punción cardiaca en tubos colectores de suero, para la obtención del suero los tubos colectores fueron centrifugados a 2012 g a temperatura ambiente por diez minutos. Del suero obtenido, 2 mL fueron empleados para el análisis de perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos totales, colesterol-LDL, colesterol-HDL y colesterol-VLDL) según la metodología descrita en el acápite 3.5.9 y lo restante se empleó para la determinación de la actividad antioxidante de la SOD.

La actividad antioxidante se analizó mediante la medición del daño oxidativo (estrés oxidativo) generado en las ratas, para ello se determinó la concentración de antioxidante enzimático, la SOD, empleando el kit de ensayo de superóxido dismutasa en el suero siguiendo la metodología descrita en el acápite 3.5.10.

Etapa					Análisis	
Obtención del hidrolizado	<pre> graph LR     A[cañihua] --&gt; B[Extracción proteica]     B --&gt; C[Hidrólisis enzimática]     C --&gt; D[Hidrolizado proteico de cañihua (HPC)]           </pre>				Características	Estudio <i>in vitro</i>
					<ul style="list-style-type: none"> <li>- Humedad</li> <li>- Proteína total</li> <li>- Grado de hidrólisis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad antioxidante (ABTS)</li> <li>- Actividad inhibidora ECA</li> <li>- Determinación del IC<sub>50</sub></li> </ul>
Estudio <i>in vivo</i>	Evaluación	Tratamientos			Tiempo	Variable dependiente
	Actividad Antihipertensiva	7 ratas	→	T 1: Sol. Salina	0 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presión arterial sistólica (PAS)</li> <li>- Presión arterial diastólica (PAD)</li> </ul>
		7 ratas	→	T 2: L-NAME + HPC	6 días	
		7 ratas	→	T 3: L-NAME + captopril	12 días	
7 ratas		→	T 4: L-NAME	18 días		
Actividad Hipocolesterolemica	6 ratas	→	T 1: Sol. Salina	35 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colesterol total (CT)</li> <li>- Triglicéridos totales (TT)</li> <li>- Colesterol-HDL (C-HDL)</li> <li>- Colesterol-LDL (C-LDL)</li> <li>- Colesterol-VLDL (C-VLDL)</li> </ul>	
	6 ratas	→	T 2: HDC + HPC			
	6 ratas	→	T 3: HDC + atorvastatina			
	6 ratas	→	T 4: HDC			
Actividad Antioxidante	6 ratas	→	T 1: Sol. Salina	35 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD)</li> </ul>	
	6 ratas	→	T 2: HDC + HPC			
	6 ratas	→	T 3: HDC + atorvastatina			
	6 ratas	→	T 4: HDC			

**Figura 3: Diseño experimental para la evaluación de hidrolizado proteico de cañihua con actividad antihipertensiva, hipocolesterolemica y antioxidante**

L-NAME: L-NG- nitroarginina metil éster, HDC: Dieta rica en colesterol, ECA: Enzima convertidora de angiotensina - I

### **3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se empleó un Diseño Multifactorial para poder analizar el efecto del hidrolizado proteico de cañihua sobre la actividad antihipertensiva siendo los factores, los tratamientos (4) y el tiempo (6), y un Diseño Completamente al Azar (DCA) para el análisis de la actividad hipocolesterolemica y la actividad antioxidante en ratas, además el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Duncan, a un nivel de significancia del cinco por ciento. Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurión XVI versión 16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., 2006).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA

El hidrolizado proteico de cañihua (HPC) se obtuvo a partir del grano de cañihua siguiendo la metodología descrita en el acápite 3.6.1. En el Cuadro 7 se presentan las características del HPC.

**Cuadro 7: Características del hidrolizado proteico de cañihua**

Análisis	Contenido
Grado de hidrólisis*	42.68±0.60
Proteína total (%) (bs)	54.40
Humedad (%)*	7.64±0.13

\* Los valores son expresados como promedio±desviación estándar (DS). Factor de conversión de nitrógeno a proteína de 5.85.

El hidrolizado proteico de cañihua obtuvo un grado de hidrólisis (GH) promedio de  $42.68 \pm 0.60$  por ciento, esta característica depende de las condiciones empleadas en la hidrólisis enzimática, tales como el tiempo, temperatura y pH, así como la relación enzima/sustrato. En un estudio previo realizado por Ochoa (2017) se determinó los parámetros de la hidrólisis enzimática, los cuales fueron empleados en la presente investigación, los cuales están descritos en el acápite 3.6.1., cabe mencionar que se realizó la hidrólisis en dos etapas empleando las enzimas Neutrasa y Alcalasa. La primera es una metaloproteasa que tiene como sitio de acción catalítica a los aminoácidos leucina (Leu) y valina (Val), y al cofactor metal hierro, su uso en la hidrólisis permite la liberación de aminoácidos hidrofóbicos (Benitez *et al.* 2008), actúa desde el interior de la proteína (acción endopeptidasa) y, a su vez, sobre los extremos de la proteína (acción exopeptidasa). Por otro lado, la Alcalasa es una endopeptidasa que actúa a partir del aminoácido serina (Ser) (Montoya *et al.* 2015).

Segura *et al.* (2010) indican que la producción de hidrolizados extensivos (> 10 % de GH) requiere el uso de más de una proteasa debido a que una sola enzima no logra obtener tales GH en un período de tiempo razonable y el fraccionamiento de los enlaces peptídicos por una endopeptidasa incrementa el número de sitios terminales de los péptidos expuestos a la acción de la exoproteasa. Comparando con estudios en granos andinos, Ochoa (2017) obtuvo un GH de 42.19±0.33, similar a lo obtenido en el presente estudio. Por su parte, Velásquez (2017) determinó en un hidrolizado de kiwicha realizado con Alcalasa/Neutrasa un valor de GH de 57.44 por ciento a los 240 minutos de reacción enzimática.

El HPC presentó un contenido de proteína de 54.40 por ciento en base seca, según Saadi *et al.* (2015) un hidrolizado proteico contiene péptidos bioactivos de cadena corta (dipéptidos y tripéptidos), cadena larga (polipéptidos), aminoácidos libres y enzima inactivada, asimismo presentó 7.64 por ciento de humedad; el contenido de proteína en base seca y humedad permitieron determinar la cantidad de HPC que se administró para las evaluaciones *in vivo*.

#### 4.2. EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA

La actividad antihipertensiva y antioxidante *in vitro* del HPC se presentan en el Cuadro 8.

**Cuadro 8: Evaluación *in vitro* de la actividad antihipertensiva y antioxidante del hidrolizado proteico de cañihua**

Evaluación	Contenido
Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol TE/mg proteína}$ )	2.08±0.05
ECA (%)	76.72±4.38
IC <sub>50</sub> (mg/mL de solución)	0.10±0.01

Los valores son expresados como promedio±DS. El valor de ECA se expresó para un contenido de proteína de 0.5 mg/mL.

La actividad antioxidante *in vitro* del HPC determinado por el método ABTS<sup>+</sup> fue de 2.08±0.05  $\mu\text{mol}$  de TE/mg de proteína. Según Borja (2014) la actividad antioxidante de los péptidos está más relacionada con su composición, estructura e hidrofobicidad, donde la cisteína (Cys), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), lisina (Lys) y metionina (Met) son ejemplos de aminoácidos que participan en la actividad antioxidante. Por otra parte, You *et al.* (2011),

Nollet y Toldrá (2015) señalan que los aminoácidos aromáticos (fenilalanina (Phe), Trp y Tyr) pueden considerarse atrapadores o donadores de protones a los radicales libres dando estabilidad. También ciertos residuos de aminoácidos, tales como la Tyr, Met, Histidina (His), Lys y Trp, pueden quelar iones metálicos pro-oxidantes, capturar radicales libres y/o extinguir el oxígeno reactivo (Erdmann *et al.* 2008). Repo-Carrasco *et al.* (2003) mencionan que la cañihua contiene Lys, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, entre otros, los cuales pueden estar formando los péptidos en el HPC. Ochoa (2017) encontró una correlación directa entre el GH y la actividad antioxidante ABTS hasta un GH de 45 aproximadamente, asimismo, Liu *et al.* (2010) señalan que el GH está relacionado con la actividad antioxidante para la mayoría de hidrolizados proteicos, donde altos valores de GH pueden estar asociados a la producción de cadenas más pequeñas y por lo tanto mayor actividad antioxidante. Por otro lado, Chabeaud *et al.* (2009) no encontraron relación entre la actividad antioxidante y el GH, indicando la importancia de las características de los péptidos (composición y secuencia de aminoácidos en la capacidad antioxidante, las cuales no se pueden atribuir a una fracción de peso molecular específico).

El HPC de la presente investigación presentó un valor similar actividad antioxidante reportado por Ochoa (2017), quien determinó una actividad antioxidante de  $2.12 \pm 0.03$   $\mu\text{mol}$  de TE/mg de proteína en un hidrolizado proteico de cañihua obtenido con la combinación de neutrasa/alcalasa por 180 minutos. Por otro lado, Cisneros (2017) obtuvo una actividad antioxidante de  $1.67$   $\mu\text{mol}$  de TE/mg de proteína para el hidrolizado de quinua con neutrasa.

Con respecto a la actividad antihipertensiva el HPC presentó 76.62 por ciento de inhibición de la actividad de la ECA (a una concentración de proteína de  $0.5$  mg/mL). He *et al.* (2013) mencionan que la inhibición de la actividad de ECA está relacionada con la reducción de la formación de angiotensina-II (vasoconstrictor) y de la degradación de la braquinina (vasodilatador), lo que contribuye a la reducción de la presión arterial.

Hayes *et al.* (2016) indican que los tres aminoácidos presentes en el extremo del C-terminal de la secuencia peptídica son particularmente importantes para la inhibición de la ECA e interactúan con el sitio activo de esta enzima. La ECA presenta afinidad con los aminoácidos hidrófobicos, incluyendo residuos aromáticos tales como Phe, Trp y Tyr y aminoácidos de cadena ramificada que incluyen Val, Leu e Ile en la secuencia al final del péptido. Por otro lado, Herrera *et al.* (2014) mencionan que la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) en el grupo C-terminal determina el efecto sobre la

inhibición de la ECA. Asimismo, Yu *et al.* (2013) señalan que la mejor relación entre la actividad antihipertensiva y estructura de péptidos inhibidores de ECA resulta de la presencia de residuos aminoácidos aromáticos, donde la presencia de Phe, Tyr o Prolina (Pro) en el C-terminal de di o tripéptidos origina una mayor actividad inhibitoria, además estos aminoácidos en el N-terminal de péptidos de cadenas largas o hidrofóbicas proporcionan una gran actividad inhibitoria, mientras que la presencia de Ser o Glicina (Gly) en el extremo N-terminal puede disminuir la actividad.

Con respecto al GH, Ochoa (2017) no encontró evidencia para afirmar que existe una relación directa entre GH y actividad antihipertensiva (ECA), asimismo Velásquez (2017) en un hidrolizado proteico de kiwicha, no obtuvieron correspondencia entre los resultados del GH con la ECA.

El valor de inhibición de la ECA fue similar al reportado por Ochoa (2017), el cual corresponde a 69.15 por ciento. Por otro lado, Velásquez (2017) determinó un porcentaje de inhibición de ECA de 72.83 por ciento en hidrolizado proteico de kiwicha obtenido con Alcalasa/Neutrasa después de 240 minutos de reacción. Por otro lado, en estudios de hidrolizado proteico de quinua, Cisneros (2017) obtuvo un porcentaje de inhibición de ECA de  $59.08 \pm 2.71$  por ciento empleando neutrasa.

El HPC presentó un valor  $IC_{50}$  de  $0.10 \pm 0.01$  mg/mL, lo que indica que se requiere una concentración de 0.10 mg/mL de proteína del HPC para producir una inhibición del 50 por ciento de la actividad ECA. Este valor es similar al reportado por Ochoa (2017), quien obtuvo un  $IC_{50}$  de 0.12 mg/mL para el hidrolizado proteico de cañihua; sin embargo, es menor comparado a estudios de otras fuentes proteicas como el de hidrolizado proteico de quinua realizado por Cisneros (2017), que presentó un  $IC_{50}$  de 0.30 mg/mL y el hidrolizado proteico de salvado arroz para el que Wang *et al.* (2017) determinaron un  $IC_{50}$  de 0.54 mg/mL, lo cual indica que se requiere una menor concentración de proteína empleando el HPC en comparación con los hidrolizados proteicos de otras fuentes.

Singh (2016) corrobora los estudios sobre péptidos antioxidantes y antihipertensivos mencionados anteriormente, indicando que la presencia de una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, es una característica típica de los péptidos inhibidores de la ECA y de los péptidos antioxidantes. Por otro lado, el tamaño del péptido también puede jugar un rol importante dado que los péptidos antihipertensivos son cortos, con sólo dos a nueve

aminoácidos, mientras que los péptidos antioxidantes contienen de tres a 16 residuos de aminoácidos (Segura-Campos *et al.* 2013), los cuales pueden estar presentes en el hidrolizado, debido a que este es una mezcla compuesta principalmente por péptidos y aminoácidos que se obtienen de la hidrólisis enzimática de las proteínas y el alto valor de GH del HPC posiblemente haya generado la producción de péptidos de cadenas más cortas (Escudero 2012, Nazeer *et al.* 2012).

### **4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIPOCOLESTEROLÉMICA Y ANTIOXIDANTE *in vivo***

Los estudios *in vitro* determinaron que el HPC presenta actividad antihipertensiva y antioxidante bajo condiciones controladas. Posterior a ello, se realizaron los estudios *in vivo* para evaluar el efecto del HPC en el organismo de la rata, debido a que los procesos metabólicos pueden influir en la actividad biológica de los compuestos. Respecto a esto, Galicia *et al.* (2013) mencionan que los estudios *in vivo* son los que determinan la utilidad y eficacia de un compuesto en el individuo, considerando además su actividad específica sobre los órganos o sistemas fisiológicos. De manera similar a la presente investigación, Nazeer *et al.* (2012) y Chen *et al.* (2003) realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* en ratas, con los que determinaron actividad antioxidante en péptidos de hidrolizado de proteína muscular de corvina y actividad antihipertensiva en el hidrolizado proteico de soya, respectivamente.

#### **4.3.1. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA**

Durante la evaluación se registró el peso de los animales cada semana, debido a que la dosificación dependía del peso, siendo la dosis de 100 mg de proteína/kg de peso corporal. En el Cuadro 9 (Anexo 5) se muestra la ganancia de peso al finalizar el estudio antihipertensivo.

Al comparar la ganancia de peso corporal de las ratas al finalizar la evaluación, se pudo observar que el grupo Control presentó mayor ganancia de peso con respecto a los demás grupos, seguido del grupo L-NAME (L-N<sup>G</sup>-nitroarginina metil éster) y por último los grupos L-NAME + Captopril y L-NAME + HPC, presentando diferencias significativas los grupos L-NAME + HPC y L-NAME + captopril con respecto al grupo control (Anexo 6).

**Cuadro 9: Control de peso corporal de ratas para el estudio antihipertensivo**

Tratamiento	Peso corporal (g)		
	Inicial	Final	Ganancia
Control	196.90±15.88	287.29±10.44	90.39±12.66 <sup>B</sup>
L-NAME + HPC	198.79±6.10	273.29±7.48	74.50±5.88 <sup>A</sup>
L-NAME + captopril	201.01±8.42	280.14±12.55	79.13±9.17 <sup>A</sup>
L-NAME	201.46±17.43	286.14±15.36	84.69±8.96 <sup>AB</sup>

Los valores son expresados como promedio±DS. Dichos valores que presentan letra capital diferente en la misma columna muestran diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para la evaluación de factor tratamiento.

Resultados similares fueron reportados en el estudio realizado por Nguelefack *et al.* (2009) en extracto acuoso de baya de Turkey (*Solanum torvum*) donde el grupo control presentó mayor incremento de peso, seguido del grupo L-NAME y por último el grupo L-NAME + captopril. Esta variación de peso de los tres grupos con inducción de hipertensión con respecto al grupo control puede deberse a lo mencionado por Chen *et al.* (2003) en el estudio de hidrolizado de soya, quienes sugieren que la ingesta de L-NAME puede estimular el sistema nervioso simpático y causar una menor asimilación de la alimentación.

La evaluación *in vivo* de la actividad antihipertensiva se realizó con la medición de la presión arterial sistólica y diastólica de las ratas de los cuatro grupos de tratamientos. En el Cuadro 10 (Anexo 7), se muestra la evolución de la presión arterial sistólica (PAS) de los grupos durante un mes. El análisis de varianza multifactorial para la PAS (Anexo 8), indica que existe un efecto significativo de los dos factores, tratamiento y tiempo. Además se puede observar que los cuatro tratamientos considerados difieren significativamente entre sí, observándose que en ciertos tratamientos y tiempo se redujo la presión arterial sistólica.

Se puede observar que la PAS de todos los grupos en el cero día fueron 107.8±7.7 mm Hg, 111.8±8.0 mm Hg, 115.3±7.9 mm Hg y 116.1±7.8 mm Hg para los grupos control, L-NAME + HPC, L-NAME + captopril y L-NAME, respectivamente, los cuales no presentaron diferencia significativa (Anexo 9), esto indica que todos estuvieron en las mismas condiciones de PAS. Sharp y Villano (2013) mencionan que un animal con una PAS entre 100 a 120 mm Hg es considerada normotensa, siendo la PAS promedio de 116 mm Hg; de

acuerdo a ello los cuatro grupos estudiados fueron normotensas y estuvieron cerca al valor promedio en el cero día.

Posterior a ello, se inició la evaluación administrando el agente inductor L-NAME a los tres grupos. Según Kuru *et al.* (2009), el L-NAME induce un incremento de la presión arterial total después de su administración. Ramírez *et al.* (2006) mencionan que el L-NAME permite el estudio de la hipertensión primaria o esencial porque se caracteriza en la disfunción endotelial, vasoconstricción, activación del sistema renina-angiotensina (SRA) y aterosclerosis similares a la hipertensión humana.

En los grupos L-NAME + captopril y L-NAME + HPC, dos horas después de la administración del L-NAME, se administró el agente hipotensor captopril y el HPC, respectivamente; mientras que, al grupo L-NAME y control se les administró solución salina, diariamente durante el mes. En este último grupo se observa la PAS no presentó diferencia significativas en el tiempo (Anexo 10).

Según Ramírez *et al.* (2006) la administración de L-NAME produce un aumento de 20 a 40 por ciento de la PAS y presión arterial diastólica (PAD) en ratas. En el estudio de Ojeda (2003) usando una dosis de 50 mg/kg de L-NAME obtuvo en 4 semanas un aumento en la PAS de 50 por ciento. Rodríguez *et al.* (2003) y Sharifi *et al.* (2005) reportan elevaciones de la PAS en un 90 a 100 por ciento después de 30 días y 12 semanas de administración, respectivamente.

En el presente estudio el L-NAME incrementó aproximadamente 60 por ciento de la PAS, dicho incremento fue significativo en el tiempo (Anexo 11). Por otro lado, la PAS final con un valor de  $184.4 \pm 10.9$  mm Hg, fue similar a la PAS de las ratas hipertensas inducidas con L-NAME del estudio de Nguelefack *et al.* (2009), donde los animales presentaron un valor mayor a 180 mm Hg después de 30 días de administración de este agente inductor.

**Cuadro 10: Evolución de la presión arterial sistólica de ratas para el estudio antihipertensivo**

Tratamiento	Presión Arterial Sistólica (mm Hg)					
	Tiempo (días)					
	0	6	12	18	24	30
Control	107.8±7.7 <sup>Aa</sup>	114.1±10.0 <sup>Aa</sup>	107.4±7.1 <sup>Aa</sup>	106.1±5.8 <sup>Aa</sup>	107.7±7.4 <sup>Aa</sup>	110.1±8.0 <sup>Aa</sup>
L-NAME + HPC	111.8±8.0 <sup>Aa</sup>	138.5±10.8 <sup>Bb</sup>	140.3±7.6 <sup>Cb</sup>	150.2±6.0 <sup>Cc</sup>	157.9±9.1 <sup>Ccd</sup>	161.6±8.7 <sup>Cd</sup>
L-NAME + captopril	115.3±7.9 <sup>Aa</sup>	116.9±8.5 <sup>Aa</sup>	116.8±4.2 <sup>Ba</sup>	121.5±5.9 <sup>Bab</sup>	124.0±4.4 <sup>Bb</sup>	122.4±3.6 <sup>Bab</sup>
L-NAME	116.1±7.8 <sup>Aa</sup>	151.0±5.6 <sup>Cb</sup>	155.1±6.1 <sup>Db</sup>	178.1±13.4 <sup>Dc</sup>	186.3±10.5 <sup>Dc</sup>	184.4±10.9 <sup>Dc</sup>

Los valores son expresados como promedio±DS. Los valores que presentan letra capital diferente en la misma columna y letra minúscula diferente en la misma fila muestran diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para la evaluación del factor tratamiento y tiempo, respectivamente.

El incremento progresivo de la PAS a causa del L-NAME hasta generar una hipertensión, puede deberse a lo mencionado por Ramírez *et al.* (2006) y Nguelefack *et al.* (2009), quienes indican que se genera vasoconstricción, ya que este agente inductor disminuye la síntesis de óxido nítrico (ON), sustancia vasodilatadora, además de la activación persistente del sistema renina-angiotensina incrementando la secreción de renina y síntesis de Angiotensina-II (vasoconstrictor), lo que resulta en un aumento de la presión arterial.

En el caso del grupo L-NAME + captopril, el incremento de la PAS no fue significativo, el cual llegó solo a un valor de  $122.4 \pm 3.6$  mm Hg al final de la evaluación (Anexo 12). Dicho valor fue cercano a una PAS normal, lo que indica que redujo la hipertensión considerablemente y esto se debe al medicamento hipotensor captopril que inhibe la ECA y previene la hipertensión aumentando la enzima ON sintasa, lo cual contribuye a una prevención completa del desarrollo de la hipertensión (Torok *et al.* 2008). Por otro lado, Paulis *et al.* (2007) mencionan que el mecanismo más importante por el cual el captopril reduce la presión arterial es la reducción del tono simpático, el cual se eleva en ratas hipertensas tratadas con L-NAME. La tendencia durante el mes fue similar a lo reportado por Nguelefack (2009), quienes emplearon una dosis de captopril de 20mg/kg/día durante cuatro semanas y en la presente investigación se empleó 40 mg/kg durante 30 días.

El grupo L-NAME + HPC, en el cual se evaluó el efecto antihipertensivo del hidrolizado proteico de cañihua a una dosis de 100 mg de proteína/kg de peso corporal, se observó que la presión incrementó de  $111.8 \pm 8.0$  a  $161.6 \pm 8.7$  mm Hg durante el mes (Anexo 13), presentando valores significativamente menores en todas las evaluaciones comparado al grupo L-NAME respecto al mismo tiempo (Anexo 14-18). Esta diferencia podría indicar que el HPC tiene un efecto antihipertensivo en ratas hipertensas inducidas por L-NAME, debido a que contrarresta el efecto de L-NAME al impedir que la PAS siga en aumento, como ocurrió en el grupo L-NAME que desarrolló la hipertensión.

Según Mulero *et al.* (2011) y Korhonen y Pihlanto (2007) la principal razón del efecto de los péptidos antihipertensivos es la inhibición de la actividad de la ECA mediante la competencia con el sustrato por el centro activo de la enzima o uniéndose a la enzima en una zona diferente al centro activo deformándolo de manera que impide el enlace con el sustrato. Udenigwe y Mohan (2014) y Maes *et al.* (2004) indican que en los últimos años además de la inhibición de la ECA, los péptidos derivados de proteínas alimentarias pueden ejercer

efectos antihipertensivo a través de otros mecanismos como el sistema endotelina y calicreína-cinina. De acuerdo a los estudios antihipertensivos *in vitro* posiblemente el HPC inhiba a la ECA en las ratas.

Por otro lado, comparando los grupos L-NAME + HPC y L-NAME + captopril, no se observó un efecto similar, esto posiblemente se debe a la potencia inhibitoria, siendo mayor el captopril que tiene un IC<sub>50</sub> de 0.004 mg/mL (Kang 2013), mientras que el HPC presentó un IC<sub>50</sub> de 0.01±0.01 mg/mL. Esto corrobora a lo mencionado por Gangopadhyay *et al.* (2016), quienes indican que los péptidos derivados de los alimentos son generalmente 10-1000 veces menos activos que fármacos comercialmente disponibles tales como el captopril. Sin embargo, el HPC redujo 24.7 mm Hg, similar a estudios de otras fuentes proteica de origen vegetal como Huang *et al.* (2011) que el hidrolizado proteico de maíz a una dosis de 100 mg/kg generó una disminución de 34.45 mm Hg al cabo de 30 días. En otro estudio con hidrolizado proteico de soya ultrafiltrada (100 mg/kg), Wu y Ding (2001) reportan que hubo una disminución de 38 mm Hg en ratas SHR en 30 días.

Respecto a la presión arterial diastólica (PAD), los estudios antihipertensivos *in vivo* generalmente no reportan la PAD, Stepien, citado por Pereira (2010) menciona que la prevalencia e importancia de la hipertensión arterial diastólica en animales como los perros y gatos no está bien definida, por lo que las recomendaciones de evaluación de la presión arterial se refieren a las medidas de PAS. No obstante, en el presente estudio con el HPC se pudo observar un efecto antihipertensivo con respecto a la PAD.

En el Cuadro 11 (Anexo 19) se muestran los valores promedio de la PAD de los tratamientos, el análisis de varianza multifactorial de la PAD| (Anexo 20), muestra que los factores tratamiento y tiempo ejercen un efecto significativo sobre esta variable. Además se puede observar que existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos evaluados.

Se puede observar que las PAD de todos los grupos en el día cero fueron similares. Los grupos Control, grupo L-NAME + HPC, grupo L-NAME + captopril y grupo L-NAME presentaron valores de 78.6±8.8 mm Hg, 78.4±11.5 mm Hg, 82.3±12.1 mm Hg y 82.0±7.2 mm Hg, respectivamente, sin presentar ninguna diferencia significativa entre los grupos (Anexo 21), lo cual indica que todos estuvieron en las mismas condiciones normales de PAD. Según Sharp y Villano (2013), la PAD de una rata en promedio es 90 mm Hg y una presión superior a este valor es considerada hipertensión arterial diastólica.

La tendencia de la PAD para los grupos L-NAME + HPC, L-NAME + captopril y grupo L-NAME fueron similares a la PAS, presentando diferencias significativas en el tiempo (Anexo 22-26), la cual incrementaba a mayor tiempo de evaluación; mientras que el grupo control presentó valores menores a 90 mm Hg, entre los cuales no hubo diferencias significativas, manteniendo una PAD normal (Anexo 27).

Al cabo del mes el grupo L-NAME presentó una hipertensión arterial diastólica, debido a que al sexto día la PAD estaba en  $125.1 \pm 5.3$  mm Hg e incrementó con el tiempo hasta un valor de  $155.2 \pm 19.4$  mm Hg al finalizar la evaluación, presentando diferencias significativas con respecto al tiempo (Anexo 28), de la misma manera que la PAS, la PAD se incrementó por efecto del L-NAME, de acuerdo a lo mencionado por Ramírez *et al.* (2006) el L-NAME inhibe la síntesis del óxido nítrico (ON). Por otro lado, la administración del medicamento hipotensor en el grupo L-NAME + captopril, generó que este incremento fuese menor llegando solo a una presión de  $94.5 \pm 12.3$  mm Hg al final de la evaluación, valor cercano a la PAD normal, presentando diferencia significativa del día cero con respecto al día 30 (Anexo 29), lo cual indica que contrarrestó el efecto del L-NAME reduciendo la hipertensión arterial diastólica. Esto corrobora a lo mencionado por Cejudo *et al.* (1998), que indica que los fármacos que actúan inhibiendo la ECA, alcanzan su efecto antihipertensivo máximo a las tres a seis semanas de iniciado el tratamiento.

**Cuadro 11: Evolución de la presión arterial diastólica de ratas para el estudio antihipertensivo**

Tratamiento	Presión Arterial Diastólica (mm Hg)					
	Tiempo (días)					
	0	6	12	18	24	30
Control	78.6±8.8 <sup>Aa</sup>	79.2±11.0 <sup>Aa</sup>	85.7±11.6 <sup>Aa</sup>	76.3±5.9 <sup>Aa</sup>	74.1±9.3 <sup>Aa</sup>	80.5±11.3 <sup>Aa</sup>
L-NAME + HPC	78.4±11.5 <sup>Aa</sup>	103.8±14.0 <sup>Bb</sup>	120.5±10.8 <sup>Bc</sup>	125.6±14.7 <sup>Ccd</sup>	133.8±12.7 <sup>Ccd</sup>	138.8±9.9 <sup>Cd</sup>
L-NAME + captopril	82.3±12.1 <sup>Aa</sup>	92.5±11.2 <sup>ABab</sup>	98.2±7.9 <sup>Ab</sup>	99.6±6.7 <sup>Bb</sup>	98.8±9.8 <sup>Bb</sup>	94.5±12.3 <sup>Bb</sup>
L-NAME	82.0±7.2 <sup>Aa</sup>	125.1±5.3 <sup>Cb</sup>	126.6±13.8 <sup>Bb</sup>	137.5±20.7 <sup>Cbc</sup>	149.1±15.0 <sup>Dc</sup>	155.2±19.4 <sup>Dc</sup>

Los valores son expresados como promedio ± DS. Los valores que presentan letra capital diferente en la misma columna y letra minúscula diferente en la misma fila muestran diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para la evaluación del factor tratamiento y tiempo, respectivamente.

En el grupo L-NAME + HPC se observó que la PAD incrementó a  $138.8 \pm 9.9$  mm Hg al mes de evaluación presentando diferencias significativas en el tiempo (Anexo 30); sin embargo, los valores fueron menores en todas las evaluaciones comparados al grupo L-NAME, esta diferencia podría indicar que el HPC presenta un efecto antihipertensivo con respecto a la PAD en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Al comparar los grupos L-NAME + HPC y L-NAME + captopril, no se observó similar efecto, de la misma manera a lo observado en la PAS, posiblemente se deba a lo mencionado en la PAS. Si bien es cierto que el grupo L-NAME + captopril redujo más la PAD que el L-NAME + HPC, Ajibola *et al.* (2013) y Soares de Castro y Sato (2015) mencionan que los compuestos sintéticos empleados como inhibidores de la ECA para la reducción de presión arterial alta, presentan efectos secundarios negativos como alergias, reducida función renal, erupciones cutáneas y angioedemas. Caso contrario con el HPC, Uhlig *et al.* (2014) mencionan que los péptidos presentan ventajas competitivas sobre los fármacos como la baja o nula toxicidad inclusive en altas concentraciones de péptido, además el HPC logró disminuir 16.4 mm Hg de la PAD.

#### **4.3.2. ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA**

Durante la evaluación del estudio hipocolesterolémico y antioxidante se registró el peso de los animales cada semana, de la misma forma que en el estudio antihipertensivo, para realizar la dosificación de 100 mg de proteína de HPC/kg de peso corporal. El registro de pesos permitió observar la evolución de los pesos corporales y ganancia durante el tiempo de evaluación de las ratas de todos los grupos, los cuales se muestran en el Cuadro 12 (Anexo 31), donde se observa que entre los grupos no presentaron diferencia significativa en cuanto a la ganancia de peso corporal (Anexo 32).

En el Cuadro 13 (Anexo 33) se muestran los parámetros que conforman el perfil lípido para la evaluación de la actividad hipocolesterolémica en ratas con hipercolesterolemia inducida por dieta rica en colesterol, los cuales son el contenido de colesterol total (CT), triglicéridos totales (TT), colesterol-HDL (C-HDL), colesterol-LDL (C-LDL) y colesterol-VLDL (C-VLDL).

**Cuadro 12: Peso corporal de ratas para el estudio hipocolesterolémico y antioxidante**

Tratamiento	Peso corporal (g)		
	Inicial	Final	Ganancia
Control	193.17±8.89	313.83±26.36	120.67±26.99 <sup>A</sup>
HCD + HPC	189.5±9.81	316.33±17.29	126.83±11.16 <sup>A</sup>
HCD + Atorvastatina	188.83±7.28	317.17±32.03	128.33±31.75 <sup>A</sup>
HCD	190.33±7.23	338.83±18.86	148.50±18.75 <sup>A</sup>

Los valores son expresados como promedio±DS. Los valores que presentan letra capital diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para la evaluación de factor tratamiento.

**Cuadro 13: Perfil lipídico en suero de ratas para el estudio hipocolesterolémico**

Tratamiento	CT	TT	C-HDL	C-LDL	C-VLDL
	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Control	85.2±13.2 <sup>a</sup>	85.7±4.8 <sup>ab</sup>	48.7±6.1 <sup>ab</sup>	19.2±7.6 <sup>a</sup>	17.3±0.9 <sup>ab</sup>
HCD + HPC	106.5±12.3 <sup>b</sup>	82.3±16.9 <sup>a</sup>	40.3±4.9 <sup>a</sup>	49.5±13.5 <sup>b</sup>	16.7±3.3 <sup>a</sup>
HCD + atorvastatina	108.5±6.4 <sup>b</sup>	112.7±9.2 <sup>bc</sup>	47.7±3.4 <sup>ab</sup>	38.5±6.1 <sup>b</sup>	22.3±1.9 <sup>bc</sup>
HCD	131.2±9.2 <sup>c</sup>	117.2±29.5 <sup>c</sup>	53.3±10.2 <sup>b</sup>	54.5±14.4 <sup>b</sup>	23.3±5.7 <sup>c</sup>

Los valores son expresados como promedio ± DS. Los valores que presentan letra minúscula diferente en la misma columna muestran diferencia significativa cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para la evaluación de los tratamientos.

El grupo control presentó un valor promedio de CT de 85.2±13.2 mg/dL, similar al grupo control del estudio realizado por Ali *et al.* (2016), Serna *et al.* (2015) y Rony *et al.* (2014), quienes reportaron un valor de 90.3 mg/dL, 80.7 mg/dL y 93.0 mg/dL, respectivamente, considerando a los animales del grupo control como ratas normocolesterolémicas. En los grupos HCD + HPC, HCD + atorvastatina y HCD se administró una dieta rica en colesterol (1% colesterol y 0.1% ácido cólico en 1 mL de aceite vegetal) para inducir la hipercolesterolemia. Según Mahmoud *et al.* (2014), una dieta rica en colesterol se emplea comúnmente como modelo de inducción para estudiar los procesos metabólicos relacionados con la hipercolesterolemia y la eficacia de los agentes hipocolesterolémicos.

Esta dieta generó un incremento del CT en los tres grupos, siendo el grupo HCD el que presentó un mayor valor comparado con el grupo control, con un valor promedio de  $131.2 \pm 9.2$  mg/dL, lo que indica que el agente inductor (dieta rica en colesterol) incrementó el CT significativamente (Anexo 34). Este valor fue similar a lo reportado por Serna *et al.* (2015) y Benhomar *et al.* (2015) donde el grupo HCD presentó una concentración de CT de 140.8 mg/dL y 139.2 mg/dL, respectivamente. Por otro lado, en el estudio de hidrolizado proteico de sardina por Ben-Khaled *et al.* (2012) el contenido del CT del grupo HCD obtuvo un valor de 97.1 mg/dL.

Con respecto a los grupos HCD + HPC y HCD + atorvastatina, se observó que las concentraciones de CT fueron menores comparadas con el grupo HCD, presentando valores de  $106.5 \pm 12.3$  mg/dL y  $108.5 \pm 6.4$  mg/dL, respectivamente, los cuales no difieren significativamente. Lo que indica que el medicamento hipocolesterolémico atorvastatina a una dosis de 2.5 mg/kg, disminuyó significativamente el CT. Ore (2008) menciona que la atorvastatina es un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima que participa en la síntesis de colesterol. Este efecto fue similar a la investigación de Rony *et al.* (2014) donde el grupo HCD + atorvastatina presentó una concentración de colesterol total de  $109.7 \pm 12.2$  mg/dL a la misma dosis.

Por otra parte, el HPC redujo aproximadamente en 25 mg/dL con respecto al grupo HCD, presentando diferencia significativa, valor superior al estudio de Ben-Khaled *et al.* (2012), quienes obtuvieron una máxima disminución de 20.88 mg/dL en el hidrolizado proteico de sardina. Udenigwe y Mohan (2014) mencionan que las proteínas y los péptidos hipocolesterolémicos funcionan por medio del aumento del catabolismo del colesterol, reducción de la síntesis de colesterol, aumento de la expresión de genes de recepción de LDL o aumento de la excreción de colesterol en las heces. Por su parte, Malaguti *et al.* (2014) mencionan que los hidrolizados proteicos compiten con el colesterol por un sitio en las micelas, la cual está conformada por ácidos biliares y otros lípidos, y es la forma en la que el colesterol es solubilizado para su absorción intestinal, de esta manera se reduce la solubilidad del colesterol, su absorción intestinal y por ende los niveles de CT. Adicionalmente, Hartmann y Meisel, citado por Benomar *et al.* (2015) encontraron que el hidrolizado proteico de pescado redujo el contenido de colesterol total inhibiendo la absorción de colesterol mediante la reducción de la solubilidad micelar del colesterol y con ello incrementando la excreción de colesterol fecal.

Con respecto al análisis de TT, el grupo control presentó un valor de  $85.7 \pm 4.8$  mg/dL, mientras que el grupo HCD presentó un incremento significativo con un valor de  $117.2 \pm 29.5$  mg/dL (Anexo 35). Los valores de los grupos control y HCD fueron similares a lo reportado por Ben-Khaled *et al.* (2012) en el estudio de un hidrolizado proteico de sardina donde el grupo control y HCD presentaron un contenido de 75.3 mg/dL y 115.1 mg/dL, respectivamente. Por otro lado, en el estudio de Ali *et al.* (2016) el incremento del contenido de TT del grupo HCD fue menor, aumentando a 97.7 mg/dL del grupo control (71.0 mg/dL). Por otro lado, el grupo HCD + atorvastatina no presentó diferencia significativa con respecto al grupo HCD. Como se mencionó con anterioridad, la atorvastatina es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, por lo que el principal mecanismo de acción es evitar la síntesis de colesterol y C-LDL.

En cuanto al grupo HCD + HPC, el contenido de TT fue de  $82.3 \pm 16.9$  mg/dL, similar al grupo control. Al comparar este valor con el grupo HCD se observa que el contenido de TT disminuyó en 34.9 mg/dL. Resultados similares fueron reportados por Ben-Khaled *et al.* (2012), donde los grupos control e hidrolizado proteico de sardina presentaron valores de 75.3 y 79.7 mg/dL, respectivamente, y la disminución de TT con respecto al grupo HCD fue de 35.4 mg/dL.

En el caso del C-HDL, lipoproteína transportadora de los lípidos desde la circulación sanguínea hacia el hígado para su excreción (Howard y Udenigwe 2013), se puede observar que todos los grupos presentaron valores entre 40 a 53 mg/dL, los cuales se encuentran cercanos al rango normal de las ratas (31.9-51.0 mg/dL) (Gross 2009). Solo se observa diferencia significativa entre el grupo HCD + HPC con respecto del grupo HCD (Anexo 36), debido a que el primer grupo presentó un contenido de C-HDL menor, situación similar a lo obtenido por Ore (2008) en el estudio de la maca amarilla, donde este alimento produjo una reducción de CT, C-LDL y TT, así como también la reducción de niveles de C-HDL. En cuanto al grupo HCD, el cual presentó el mayor valor, este comportamiento fue similar al estudio de Serna *et al.* (2015) donde el grupo control obtuvo un valor de 40 mg/dL y el grupo hipercolesterolémico aproximadamente 50 mg/dL.

Con respecto al C-LDL, lipoproteína que transporta lípidos desde el hígado hacia los demás órganos, se puede observar que el grupo control presentó un valor de  $19.2 \pm 7.6$  mg/dL, menor en comparación a los grupos HCD + HPC, HCD + atorvastatina y HCD; entre estos tres grupos no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de C-LDL

(Anexo 37). El alto nivel de C-LDL en ratas HCD, según Ben-Khaled *et al.* (2012) puede atribuirse a una regulación negativa en los receptores LDL por el colesterol inducido en la dieta.

El grupo HCD + atorvastatina presentó un contenido de C-LDL de  $38.5 \pm 6.1$  mg/dL, si bien este valor no difiere significativamente del grupo HCD, Ore (2008) menciona que la atorvastatina al ser un inhibidor de la HMG CoA reductasa, genera que el organismo produzca menos colesterol, y cuando se retarda la producción de colesterol, el hígado comienza a producir más receptores de C-LDL, estos receptores capturan las C-LDL reduciendo así la cantidad de C-LDL en el torrente sanguíneo. Por otra parte, la administración de 100 mg de proteína de HPC/kg peso corporal en el grupo HCD + HPC al parecer no redujo de manera significativa la concentración de C-LDL, similar al grupo HCD + atorvastatina, posiblemente se deba a la característica propia de los estudios *in vivo*, por su alta variabilidad entre los animales.

Con respecto al C-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad transportadora de los triglicéridos desde el hígado hacia los tejidos vascular, adiposo y muscular (Voet 2009), se observa que todos los grupos estuvieron en el rango de 16.7 a 23.3 mg/dL, siendo los grupos control y HCD + HPC menores significativamente que el grupo HCD (Anexo 38). El grupo HCD presentó una mayor concentración de C-VLDL debido a que la síntesis hepática de esta lipoproteína aumenta por el incremento de triglicéridos en el hígado producto de la ingesta de grasa de la dieta. El grupo HCD + atorvastatina presentó una concentración de C-VLDL de  $22.3 \pm 1.9$  mg/dL, similar al valor del grupo HCD, esto coincide con los resultados obtenidos para el contenido de TT, en los que ambos grupos presentaron los mayores valores de TT.

Las ratas del grupo HCD + HPC presentaron una menor concentración de C-VLDL con respecto a los dos grupos, lo cual indica que se requiere menos lipoproteínas para transportar los triglicéridos sintetizados en el hígado, esto corrobora el análisis de TT donde el grupo HCD + HPC presentó menor valor comparado con el grupo HCD y el grupo HCD + atorvastatina. Sirtori *et al.* (2004) demostraron que la administración oral del aislado de proteína de lupino (50 mg/día) redujo significativamente tanto el C-VLDL y C-LDL. Por otra parte, Yang y Kadowaki (2009) han identificado que la estimulación de la producción biliar y la inhibición de la secreción hepática de colesterol en C-VLDL son relevantes para

la acción hipocolesterolémica de las proteínas de arroz en ratas alimentadas con dietas enriquecidas con colesterol.

En base a los parámetros analizados, se podría indicar que la dieta rica en colesterol administrada al grupo HCD dio como resultado un aumento significativo de CT, TT, C-LDL y C-VLDL, con respecto al grupo control. Según Ali *et al.* (2016) y Voet (2009) numerosos estudios demostraron que los aumentos de los niveles de CT y C-LDL son factores de riesgo de desarrollar aterosclerosis, enfermedades coronarias y cardiovasculares. El incremento de los lípidos en ratas hipercolesterolémicas puede estar asociada a una mayor actividad de la enzima esteroil-CoA desaturasa estimulada por el colesterol y el ácido cólico de las dietas, donde la presencia del colato es necesaria para inducir la hipercolesterolemia ya que las ratas son resistentes a los efectos del colesterol de la dieta (Serna *et al.* 2015).

Por otro lado, la ingesta del medicamento hipocolesterolémico generó una disminución del CT del grupo HCD + atorvastatina respecto al grupo HCD. Si bien, el contenido de TT, C-LDL, C-HDL y C-VLDL del grupo HCD + atorvastatina no difirieron significativamente de los valores del grupo HCD, Heeba y Abd-Elghany (2010), indican que las estatinas (atorvastatina) no sólo inhiben la síntesis de colesterol, sino que además, estimulan la captación y la degradación de las C-LDL, aumentan moderadamente las C-HDL y reducen las concentraciones séricas de los TT de una forma moderada y variable, factores favorables para disminuir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. Esta diferencia podría atribuirse a las condiciones consideradas en el presente estudio, tales como dosis y tiempo. Sin embargo, se sabe que los fármacos hipocolesterolemicos como la atorvastatina poseen efectos secundarios como hepatotoxicidad, miopatía e insuficiencia cardiaca (Ali *et al.* 2016 y Serna *et al.* 2015).

En base a los resultados del perfil lipídico, el HPC bajo una administración de 100 mg de proteína/kg peso corporal produjo una reducción significativa de los niveles de CT, TT, C-VLDL con respecto al grupo HCD, por otro lado no se observó una disminución significativa del C-LDL ni un incremento en el contenido de C-HDL. Antúnez *et al.* (2008), Serna *et al.* (2015) y Ali *et al.* (2016) indican que una reducción de C-LDL y manteniendo o incrementando los niveles de C-HDL son importantes para considerar un efecto hipocolesterolémico. Debido a que dicha situación está asociada a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, siendo la hipercolesterolemia un factor importante de estas enfermedades (Ali *et al.* 2016). De acuerdo a ello, el HPC a las condiciones evaluadas no

evidenció un efecto hipocolesterolémico. Sin embargo, Howard y Udenigwe (2013) mencionan que los resultados de las evaluaciones hipocolesterolemicas dependen de la diversidad fisiológica de los modelos animales en condiciones normales y al ser inducidos por la dieta de hipercolesterolemia, los cuales pueden afectar el perfil lípico inicial y la posterior respuesta de los animales a los tratamientos de hidrolizado de proteínas. Otras fuentes de variación incluyen las diferentes dosis dietéticas de los hidrolizados y la duración de los tratamientos. Esto podría indicar la posibilidad de emplear una mayor dosis o mayor tiempo de evaluación y con ello evidenciar cambios notorios en el contenido de lipoproteínas (C-LDL y C-HDL).

#### 4.3.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante del hidrolizado proteico de cañihua se analizó en el suero de las ratas sometidas al estudio de la actividad hipocolesterolémica, por medio de la evaluación de la variación de la actividad específica de la enzima SOD, ya que esta junto a otros compuestos pueden actuar sobre las especies reactivas de oxígeno. Los resultados son mostrados en el Cuadro 14 (Anexo 39).

La actividad específica de la enzima antioxidante SOD del grupo control fue  $1.71 \pm 0.15$  U/mg de proteína, por otro lado, el grupo HCD presentó una menor actividad específica de SOD al presentar  $1.42 \pm 0.10$  U/mg de proteína, comparando ambos grupos se observa que la actividad específica de la SOD se redujo significativamente en el suero de las ratas con hipercolesterolemia inducida con dieta rica en colesterol del grupo HCD (Anexo 40).

**Cuadro 14: Estudio antioxidante en suero de ratas hipercolesterolémicas**

Tratamiento	SOD (U/mg proteína)
Control	$1.71 \pm 0.15^b$
HCD + HPC	$1.76 \pm 0.19^b$
HCD + atorvastatina	$1.86 \pm 0.23^b$
HCD	$1.42 \pm 0.10^a$

Los valores son expresados como promedio $\pm$ DS. Los valores que presentan letra diferente en la misma columna muestran diferencia significativa cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para la evaluación de los tratamientos.

Rony *et al.* (2014) mencionan que las dietas con alto colesterol aumentan la producción de especies reactivas al oxígeno (ERO) *in vivo*, seguido del estrés oxidativo e hipercolesterolemia. A su vez, Otunola *et al.* (2014) mencionan que la alteración en el metabolismo de colesterol y triglicéridos como resultado de la hipercolesterolemia afecta negativamente a los biomarcadores de estrés oxidativo y promueve la producción de ERO.

Según Lahera *et al.* (2000), el C-LDL aumenta la producción de ERO como el anión superóxido y en el estudio hipocolesterolémico de la presente investigación se observó un incremento de C-LDL en el grupo HCD, debido a que el C-LDL es susceptible a sufrir modificaciones oxidativas y origina la peroxidación lipídica. Zeng *et al.* (2017) mencionan que la peroxidación lipídica es uno de los mecanismos más importantes que contribuyen al estrés oxidativo.

Durante el estrés oxidativo el organismo responde activando los mecanismos de defensa antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y los no enzimáticos tales como el ácido ascórbico y glutatión reducido (GSH). Según Ukeda *et al.* (1998) y Zeng *et al.* (2017), la SOD es una de las más importantes enzimas antioxidantes, debido a que es la primera defensa antioxidante al dismutar el anión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno; la CAT cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno producido por la SOD en agua y oxígeno y el GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno en agua. Ben-Khaleh *et al.* (2012) y Rony *et al.* (2014) mencionan que un elevado estrés oxidativo, probablemente disminuyen la actividad de las defensas antioxidantes.

Otunola *et al.* (2014) encontraron una reducida actividad enzimática hepática, renal, cardíaca y cerebral de la SOD en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolemica (grupo HCD), lo cual atribuyen al resultado de una mayor demanda de las enzimas antioxidantes para desactivar la alta afluencia de ERO generada por la dieta rica en colesterol, la insuficiencia de las enzimas o la falla del sistema de defensa antioxidante para superar la afluencia del ERO.

Por otro lado, el grupo HCD + atorvastatina y HCD + HPC presentaron valores similares entre sí, superiores al grupo HCD y similares al grupo control. Con respecto al grupo HCD + atorvastatina, en el cual se administró atorvastatina después de una dieta rica en colesterol, este resultado puede deberse a lo mencionado por Chegwin *et al.* (2012), quienes indican

que en estudios clínicos se ha evidenciado que las estatinas, grupo al que pertenece la atorvastatina, exhiben efectos antiinflamatorio o antioxidante, independientemente de la reducción en los niveles de colesterol. En este caso presentó un efecto antioxidante al prevenir la oxidación del C-LDL, tal como lo menciona Chegwin *et al.* (2012), disminuyendo la posible producción del radical libre superóxido y manteniendo la actividad de la SOD respecto al grupo control. Similar al estudio de Rony *et al.* (2014) donde el grupo HCD + atorvastatina presentó actividad de SOD hepático similar al grupo control y, a su vez, mayor que el grupo HCD.

En el caso del grupo HCD + HPC presentó una actividad específica de  $1.76 \pm 0.19$  U/mg de proteína, similar y mayor respecto al grupo control y HCD, respectivamente; lo que podría indicar que la administración de 100 mg de proteína del HPC durante 35 días contrarrestó significativamente la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes con respecto a las ratas alimentadas con dieta rica en colesterol del grupo HCD. Esta situación fue similar al estudio de Ben-Khaled *et al.* (2012) donde el grupo control y grupos tratados con hidrolizados proteicos de sardina obtenidos por diferentes enzimas proteolíticas presentaron valores de SOD hepático similares y mayores que el grupo HCD.

De acuerdo a los resultados el HPC se podrían indicar que presenta una actividad antioxidante *in vivo* con respecto a la actividad específica de la SOD. El mecanismo exacto de la actividad antioxidante de péptidos aún no está esclarecido. Varios estudios han expuesto que estos péptidos son inhibidores de la peroxidación de lípidos, atrapadores de radicales libres y quelantes de iones metálicos de transición (Mulero *et al.* 2011, Navam *et al.* 2011, Ajibola *et al.* 2013), bajo esta premisa el hidrolizado proteico de cañihua pudo atrapar a los radicales libres como el radical superóxido que se formaron por la dieta rica en colesterol y convertirlo a peróxido de hidrógeno.

Giri y Ohshima (2012) y Soares de Castro y Sato (2015) indican que los aminoácidos hidrofóbicos son importantes para la mejora de las propiedades antioxidantes, debido a que incrementan la accesibilidad de los péptidos hacia dianas celulares de naturaleza hidrofóbica. Su presencia en el extremo N-terminal contribuye a que se inhiba la peroxidación lipídica porque se incrementa la solubilidad del péptido en los lípidos, facilitando de este modo la interacción de éstos con las especies radicales. La presencia de un residuo de aminoácido en el C-terminal (generalmente aromáticos) cumple la función de donador de electrones, lo cual contribuye la capacidad antioxidante al estabilizar las ERO transfiriéndoles electrones.

Asimismo, Benomar *et al.* (2015) mencionan que el efecto antioxidante de hidrolizado proteico pueda deberse a la composición de los aminoácidos, siendo los aminoácidos hidrofóbicos quienes actúan como eliminadores de radicales o quelantes de metales de transición y probablemente inhiba las modificaciones oxidativas de la síntesis de C-LDL.

## V. CONCLUSIONES

- El hidrolizado proteico de cañihua (HPC) con un contenido de proteína de 54.40 por ciento, una humedad de  $7.64 \pm 0.13$  por ciento y un grado de hidrólisis de  $42.68 \pm 0.60$  por ciento, presentó una actividad antioxidante *in vitro* medida por el método ABTS de  $2.08 \pm 0.05$   $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína y una antihipertensiva *in vitro* con  $76.72 \pm 4.38$  por ciento de inhibición de la ECA y un  $\text{IC}_{50}$  de  $0.10 \pm 0.01$   $\text{mg/mL}$ .
- El HPC evaluado en ratas albinas machos a una dosificación única de 100 mg proteína/kg peso corporal presentó una actividad antihipertensiva *in vivo*, actividad antioxidante *in vivo* y no se evidenció la actividad hipocolesterolemica *in vivo*.
- El HPC presentó actividad antihipertensiva *in vivo* a una dosis de 100 mg proteína/kg peso corporal administrado a ratas con hipertensión inducida por L-NAME, reduciendo significativamente la presión arterial sistólica de  $184.4 \pm 10.9$  a  $161.6 \pm 8.7$  mm Hg y la presión arterial diastólica de  $155.2 \pm 19.4$  a  $138.8 \pm 9.9$  mm Hg con respecto a las ratas hipertensas inducidas por L-NAME, al cabo de un mes.
- La administración del HPC a una dosis de 100 mg de proteína/kg peso corporal en las ratas con hipercolesterolemia inducida con dieta rica en colesterol (HCD) redujo significativamente los niveles séricos de colesterol total (CT), triglicéridos totales (TT) y colesterol-VLDL (C-VLDL); sin embargo, disminuyó los valores de C-HDL y no se evidenció una disminución significativa del C-LDL, con respecto a las ratas con hipercolesterolemia inducida, presentando valores de CT de  $106.5 \pm 12.3$   $\text{mg/dL}$  y  $131.2 \pm 9.2$   $\text{mg/dL}$ , TT de  $82.3 \pm 16.9$   $\text{mg/dL}$  y  $117.2 \pm 29.5$   $\text{mg/dL}$ , C-HDL de  $40.3 \pm 4.9$   $\text{mg/dL}$  y  $53.3 \pm 10.2$   $\text{mg/dL}$ , C-LDL de  $49.5 \pm 13.5$   $\text{mg/dL}$  y  $54.5 \pm 14.4$   $\text{mg/dL}$ , y C-VLDL de  $16.7 \pm 3.3$   $\text{mg/dL}$  y  $23.3 \pm 5.7$   $\text{mg/dL}$ , respectivamente. Por lo que bajo las condiciones experimentales del presente estudio sobre ratas HCD no fue suficiente para producir una actividad hipocolesterolemica significativa.

- El HPC presentó un efecto antioxidante *in vivo* en ratas hipercolesterolemicas inducidas con dieta rica en colesterol (HCD ) al mantener la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa (SOD) respecto al grupo control, con un valor de  $1.76 \pm 0.19$  U/mg proteína, a pesar de inducir el estrés oxidativo con la dieta rica en colesterol.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar diferentes dosis de hidrolizado proteico de cañihua para la evaluación *in vivo* de la actividad hipocolesterolémica.
- Evaluar otras propiedades bioactivas de los péptidos tales como antiinflamatorio, antimicrobiana, entre otros.
- Realizar estudios de purificación e identificación de los péptidos del hidrolizado proteico de cañihua.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, J; Angeles, J; Rivera, H; Petricevich, V; Nolasco, N; Collí, D; Santa-Olalla, J. 2013. Modelos *in vitro* para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. Ed Segura, M; Chel, L; Betancur, D. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona. OmniaScience 29-82.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27:1256-1262.
- Ahrén, I; Xu, J; Önning, G; Olsson, C; Ahrné, S; Moin, G. 2014. Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. *Clinical Nutrition*. 34:719-726.
- Ajibola, C; Fashakin, J; Fagbemi, T; Aluko, R. 2013. Renin and angiotensin converting enzyme inhibition with antioxidant properties of African yam bean protein hydrolysate and reverse-phase HPLC-separated peptide fractions. *Food Research international* 52(2):437-444.
- Aleixandre, M; Miguel, M. 2009. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias. Madrid, España. Editorial Complutense.
- Ali, R. 2016. Hypocholesterolemic effects of diets containing different levels of kishk as a dried fermented milkewhole wheat mixture in rats. *Journal of Ethnic Foods* 1-7.
- Aluko, R; Monu, E. 2003. Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science* 68(4):1254-1258.

- Ambigaipalan, P; Al-Khalifa, A; Shahidi, F. 2015. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods* 18:1125–1137.
- Antúnez, J; Hernández, F; Aquino, M; Ibarra, S; Rodríguez, L. 2008. 2,4,5-trimethoxycinnamic acid: the major metabolite of a-asarone, retains most of the pharmacological properties of a-asarone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 24(3):903-909.
- Apaza, V. 2010. Manejo y Mejoramiento de Kañiwa. Convenio Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA-Puno, Centro de Investigación de Recursos Naturales y Medio Ambiente-CIRNMA, Bioversity International y el International Fund for Agricultural Development - IFAD. Puno, Perú.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist, US). 2007. Official Methods of analysis of AOAC International. Horwitz, W (ed). 18 ed. Whashington, Estados Unidos.
- Asoodeh, A; Mina, Y; Jamshidkhan, C. 2012. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Journal of Food Chemistry* 131:291-295
- Awad, S; El-Sayed, M; El Attar, A; Yousef, M. 2016. Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Dairy Science* 99(11):1-12.
- Badui, S. 2006. Química de los alimentos. México. 4 ed. Editorial Pearson Educación. 736 p.
- Barbana, C; Boye, J. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry* 127:94–101.
- Beas, F; Loarca, P; Guzmán, M; Rodríguez, M; Vasco, M; Guevara, L. 2011. Nutraceutic potential of bioactive components present in huitlacoche from the central zone of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 42(2):36-44.

- Beltrán, L. 2010. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante en leches fermentadas por *Lactococcus lactis*. Tesis Lic. Querétaro, México. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Benitez, R; Ibarz, A; Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 42(2):5-13.
- Benomar, S; Yahia, S; Dehiba, F. 2015. Differential antioxidative and hypocholesterolemic responses to two fish protein hydrolysates (*Sardina pilchardus* and *Boops boops*) in cholesterol-fed rats. *Nutrition & Food Science* 45(3):448-466.
- Ben-Khaled, H; Ghilissi, Z; Chtourou, Y; Hakim, A; Ktari, N; Ayadi, M; Barkia, A; Sahnoun, Z; Nasri, M. 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Journal Food Research International*. 45:60-68.
- Biere, J; Tohá, C. 2007. Comparacion de la eficacia hipolipemiente de *Commiphora mukul* y *Monascus purpureus* en ratas. Tesis Lic. Chile. Universidad de Chile. 51.
- Blanco, T; Alvarado-Ortiz, C; Muñoz, AM. 2005. Evaluación de la composición nutricional de la maca y cañihua, procedente de diversos departamentos del Perú. *Acta Médica Sanmartiniana*. 1(1):1-5.
- Boada, M; Colom, N; Castelló, N. 2011. La experimentación animal (en línea). Consultado 20 feb 2017. Disponible en [http://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2011/80084/la\\_experimentacion\\_animal.pdf](http://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2011/80084/la_experimentacion_animal.pdf).
- Chabeaud, A.; Vandanjon, L.; Bourseau, P.; Jaouen, P.; Chaplain-Derouiniot, M.; Guerard, F. 2009. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology* 66(3):463-471.
- Castro, I. Tirapegu, J; Benedicto, M. 2003. Effects of diet supplementation with three soluble polysaccharides on serum lipid levels of hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry*. 80:323-330

- Cejudo, R; Palomares, M; Pasos, F. 1998. Hipertension arterial: actualización de su tratamiento. *Informacion Terapeutica del Sistema Nacional de Salud* 22(4):81-94.
- Chegwin, C; Nieto, I; Atehortúa, L; Sepúlveda, L. 2012. Las estatinas: actividad biológica y producción biotecnológica. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(2):157-178.
- Chen JR, Yang SC, Suetsuna K, Chao JCJ. 2003. Soybean protein-derived hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal Food Biochem* 28:61–73.
- Cian, R; Drago, S; González, R. 2011. Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina INNOTECH (6).
- Cisneros, M. 2017. Purificación de péptidos bioactivos de quinua (*Chenopodium quinoa*) con capacidad antioxidante y antihipertensiva. Tesis Ing. UNALM. Lima, Perú. 117 p.
- Corrales, L; Muñoz, M. 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova – Publicación científica en ciencias biomédicas* 10(18):135-250.
- Djerrou, Z. 2014. Anti-hypercholesterolemic effect of Pistacia lentiscus fatty oil in egg yolk-fed rabbits: a comparative study with simvastatin. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 12(8):561-566.
- Elavarasan, K; Shamasundar, B; Badii, F; Howell, N. 2016. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). *Journal Food Chemistry*. 206:210–216.
- Erdmann, K; Cheung, B; Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19:643-654.

- Escudero, E. 2012. Estudio de pequeños péptidos (<1500 Da) con actividad antihipertensiva y antioxidante generados en el jamon curado. Tesis Dr. España. Universidad Politecnica de Valencia. 200 p.
- Espinoza, E. 2014. Hidrolisis enzimática de proteína concentrada de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) para la obtención de péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva. Tesis Mg. UNALM. Lima, Perú.
- Estaña, W; Muñoz, C. 2012. Variabilidad genética de cañihua en las provincias de Puno. Editorial DISKCOPY S.A.C. Puno, Perú. Consultado: 04 may 2017. Disponible en: [http://quinua.pe/wpcontent/uploads/2015/06/Variabilidad\\_genetica\\_ca%C3%B1ihua\\_puno.pdf](http://quinua.pe/wpcontent/uploads/2015/06/Variabilidad_genetica_ca%C3%B1ihua_puno.pdf)
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación). 1994. Neglected crops 1492 from a different perspective. Plant Production and Protection Series. N°26. ISBN 92-5-103217-3.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación), Universidad de las Naciones Unidas (UNU) y OMS (Organización Mundial de la Salud). 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (WHO Technical Report Series 935).
- Fernández, R. 2015. Péptidos derivados de lactoferrina bovina contra la hipertensión arterial: inhibición de los sistemas angiotensina y endotelina. Tesis Dr. Valencia, España. Universidad de Valencia. 290 p.
- Fernández, R; Castelló, M; Arce, C; Manzanares, P; Ivorra, D; Salom, J. 2014. Antihypertensive mechanism of lactoferrin-derivad peptides: Angiotensin receptor blocking effect. Journal of agricultural and Food Chemistry 173-181.
- Fletcher, B; Berra, K; Braun, L; Ades, P; Goff, D, Stone, N. 2005. Managing blood lipids: a collaborative approach. Journal of Circulation. 112:3184-3209.

- Freeman, H. 2015. Clinical relevance of intestinal peptide uptake. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 6(2):22–27.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., Añón, M. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Journal of Food chemistry* 126(3):878-84.
- Fujita, H; Yokoyama, K; Yoshikawa, M. 2000. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal Food Science* 65:564–569.
- Galicia, S; Torruco, J; Negrete, E; Cadena, M; Acevedo, J; Angeles, J; Santa-Olalla, J; Petricevich, V. 2013. Actividad de los hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens* en modelos *in vivo* que revierten enfermedades incluidas dentro del síndrome metabólico. *OmniaScience* 155-173.
- Gangopadhyay, N; Wynne, K; O' Connor, P; Gallagher, E; Brunton, N; Rai, D; Hayes, M. 2016. *In silico* and *in vitro* analyses of the angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeus vulgare*) protein concentrates. *Food Chemistry* 203:367-374.
- Ganong, W.F. 2005. *Fisiología Médica*. 20 ed. Manual Moderno, Mexico DF, México.
- García, A; Castelló, M; Gimeno, J; Manzanares, P. 2014. *In vivo* antihypertensive mechanism of lactoferrin-derived peptides: Reversion of angiotensin I- and angiotensin II-induced hypertension in Wistar rats. *Journal of Functional Food* 15:294-300.
- García, F. 2008. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis Dr. Murcia, España. Universidad de Murcia. 205p.
- Gil, A. 2010. *Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Madrid, ES. Editorial Médica Panamericana. 2 ed. Tomo II 786 p.
- Giri, A; Ohshima, T. 2012. Bioactive marine peptides: Nutraceutical value and novel approaches. *Advances in Food and Nutrition Research* 65:1000-1043.

- Gross, D. 2009. Animal models in cardiovascular research. New York, Estados Unidos. 3 ed. Springer 446 p.
- Hassimotto, N; Lajolo, F. 2011. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries. *Journal of Science Food Agriculture*. 91:523-531.
- Hartmann, R; Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Journal Current opinion in biotechnology* 18:163-169.
- Hayes, M; Mora, L; Hussey, K; Aluko, R. 2016. Boarfish protein recovery using the pH-shift process and generation of protein hydrolysates with ECA-I and antihypertensive bioactivities in spontaneously hypertensive rats. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37:253-260.
- Heeba, G; Abd-Elghany, M. 2010. Effect of combined administration of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and atorvastatin on the liver of rats. *Journal Phytomedicine* 17:1076-1081.
- He, R; Alashi, A; Malomo, M; Girgih, A; Chao, D; Ju, X; Aluko, R. 2013. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry* 141:153-159.
- Hernández-Ledesma, B; García-Nebot, M; Fernández-Tomé, S; Amigo, L; Recio, I. 2014. Dairy proteins hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal* 38(2):82-100.
- Hernández-Ledesma, B; Contreras, M; Recio, I. 2011. Antihypertensive Peptides: Production, Bioavailability and Incorporation into Foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165:23-35.
- Herrera, F; Betancur, D; Segura, M. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad. *Nutrición Hospitalaria*. 29(1):10-20.

- Higinio, VA. 2011. Elaboración de una mezcla instantánea de arroz (*Oryza sativa*), Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) y Kiwicha (*Amarantus caudatus*) por el método de cocción extrusión. Tesis Ing. Universidad de Callao. Callao, Perú.
- Howard, A.; Udenigwe, C. 2013. Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. *Food & Function* 4:40-51.
- Huang, W; Sun, J; He, H, Dong, H; Li, J. 2011. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 128:968-973.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2014. Compendio Estadístico Perú 2014. Capítulo 12.
- Iwaniak, A., Minkoewicz, P. 2007. Proteins as the source of physiologically functionally active peptides. *Acta Scientiarum. Polonorum Tecnología Alimentarias* 6(3):5-15.
- Je, J; Lee, K; Lee, M; Ahn, C. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42:1266-1272.
- Kang, M; Kim, Y; Bolormaa, Z; Kim, M; Seo, G; Lee, J. 2013. Characterization of an Antihypertensive Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide from the Edible Mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biomedical Research International* 1-6.
- Knopp, R. 1999. Drug treatment of lipid disorders. *The New England Journal of Medicine* 341(7):498–511.
- Ktari, N; Nasri, R.; Mnafigui, K; Hamden, K; Belguith, O; Boudaouara, T. 2014. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats. *Process Biochemistry* 49:890–897.

- Ko, S; Lee, J; Byun, H; Lee, S; Jeon, Y. 2012. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochemistry* 47:34-40.
- Korhonen, H; Pihlanto, A. 2003. Bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*. 9(16):297-308.
- Korhonen, H; Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16:945-960.
- Korhonen, H; Pihlanto, A. 2007. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Willey-Interscience.
- Kuru, O; Sentürk, U; Kocer, G; Özdem, S; Basskurt, O; Cetin, A; Yesilkaya, A; Gündüz, F. 2009. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *Journal of Applied Physiology* 107:896-902.
- Lahera, V; Navarro, J; De las Heras, N; Vázquez, S; Cediél, E, Sanz, D; Cachofeiro, V. 2000. Efecto de las estatinas sobre la presión arterial. *Revista Hipertensión y Riesgo Vascular* 17(8):357-364.
- Li, G; Qu, M; Wan, J; You, J. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16:275–280.
- Lin, F; Chem, L; Chiang, R; Zhang, Z; Wang, J; Cai, M; Li, Y. 2011. Pilot-scale production of low molecular weight peptides from corn wet milling byproducts and the antihypertensive effects *in vivo* and *in vitro*. *Journal Food Chemistry* 124:801-807.
- Lowry, O; Rosebough, N; Lewistarr, A; Randall, R. 1951. Protein Measurement with the FolinPhenol Reagent. *Journal Biological Chemical* 193:265–275.

- Maes, W; Van, J; Vermeirssen, V; Hemeryck, M; Ketelslegers, J; Schrezenmeier, J; Huyghebaert, A. 2004. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Journal Regulatory Peptides* 118:105–109.
- Mahmoud, H.; Zaki, H.; Sherbiny, G.; Abd El-Latif, H. 2014. Modulatory role of chelating agents in diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* 52(1):27-39.
- Maicas C, Lázaro E, Alcalá J, Hernández P, Rodríguez L. 2003. Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio*. 5(3):141-160.
- Malaguti, M; Dinelli, G; Leoncini, E; Bregola, V; Bosi, S; Cicero, A; Hrelia, S. 2014. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:21120-21135.
- Meisel, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*. 8:363-373.
- Memarpoor, M; Asoodeh, A; Chamani, J. 2012. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4(1):278–286.
- Metchi, F; Nguemfo, E; Nana, P; Temdié, J; Lemba, E; Nkeng-Efouet, P; Dongmo, A; Dimo, T. 2013. Cardioprotective effects of methanol/methylene chloride extract of *Vitex cienkowskii* (Verbeceae) in L-NAME induced hypertension in rats. *European Journal of Integrative Medicine*. 5:519-526.
- Montoya, A; Gómez, M; Reyes, C; Milán, J; González de Mejía, E. 2015. Identification of bioactive peptide sequences from *Amaranth* (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14:139-158.

- Mujica, A; Jacobsen, S; Ortiz, R; Canahua, A; Apaza, V; Aguilar, HPC; Dupeyrat, R. 2002. La cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en la nutrición humana del Perú. Puno, Perú.
- Mulero, J; Zafrilla, P; Martínez-Cachá, A; Leal, M; Abellán, J. 2011. Péptidos bioactivos. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 23(5): 219-227.
- Navam, S; Sato, K; Marshall, M; Kannan, A. 2011. Bioactive food proteins and peptides. Applications in human health. New York, Estados Unidos. Editorial CRC. 348p.
- Nazeer, R; Sampath, N; Jai, R. 2012. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. Elsevier 35(2):261-268.
- Navarro, J; Ramírez, R; Villagrán, C. 2012. Manual de Procedimientos Recomendables para la Investigación con Animales. Ciudad de México, ME. Samsara.
- Nguelefack, T; Mekhfi, H; Dongmo, A; Dimo, T; Watcho, P; Zoheir, J; Legssyer, A; Kamanyi, A; Ziyat, A. 2009. Hypertensive effects of oral administration of the aqueous extract of *Solanum torvum* fruits in L-NAME treated rats: Evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. Journal of Ethnopharmacology. 124:592-599.
- Nollet, L; Toldrá, F. 2015. Handbook of Food Analysis. 3rd Ed. Vol 2. CRC Press. Florida, EE.UU.
- Noori, S. 2012. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. Scientific reports 1(8):1-9
- Ochoa, K. 2017. Hidrólisis enzimática en una y dos etapas de la proteína de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) para la obtención de péptidos bioactivos. Tesis Ing. UNALM. Lima, Perú. 129 p.
- Ojeda, D. 2003. Efecto del mofetil micofenolato sobre el sistema calicreínacinas en el modelo experimental de inhibición de la síntesis de óxido nítrico en ratas con L-NAME. Valdivia, Chile. Tesis Med Vet. Universidad de Austral de Chile. 48p.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra. Serie de informes técnicos 916.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013. Información general sobre la hipertensión en el mundo (en línea). Ginebra, SU. Consultado 29 mar. 2016. Disponible en [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO\\_DCO\\_WHD\\_2013.2\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf)
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2015. Enfermedades Cardiovasculares (en línea). Ginebra, Suiza. Consultado 10 may 2017. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
- Ore, M. 2008. Efecto hipolipémico y antioxidante de *Lepidium meyenii* Walp en ratas. Tesis Dr. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 104 p.
- Otunola, G.; Oloyede, O.; Oladiji, A.; Afolayan, A. 2014. Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. *Biological Research* 47(1):5.
- Paulis L; Líšková, S; Pintérová, M; Dobešová, Z; Kuneš, J; Zicha, J. 2007. Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. *Acta Physiological*. 191:255-266.
- PPAB (Planta Piloto de Alimentos Balanceados). sf. Dieta estándar para ratas. Lima, Perú.
- Paredes, F; Roca, J. 2002. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm* 21(7):96-100.
- Pereira, C. 2010. Análisis comparativo del efecto antihipertensivo de los extractos de diferentes especies vegetales en ratas hipertensas y de los métodos L-NAME y goldblatt utilizados para generar hipertensión. Santiago de Chile, Chile. Tesis Med Vet. Universidad Austral de Chile, Chile.
- Pérez, P; Pérez, J. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. 29(3):192-198.

- Pihlanto, A; Korhonen, H. 2003. Bioactive peptides and proteins. Journal Advances in food and nutrition research. 47: 175-276.
- Ramírez J, Palacios M, Gutiérrez O. 2006. Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. Colombia Médica. 37(1):53-60
- Ray, P; Huang, Y; Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Journal Cellular signaling 24:981–990
- Re, R.; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice- Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical and Biological Medicine 26:1231–1237.
- Repo-Carrasco, R. 1992. Cultivos andinos y la alimentación infantil. Lima, Perú. Didi de Arteta.
- Repo-Carrasco, R.; Espinoza, C. y S. Jacobsen. 2003. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International 19(2):179–189.
- Repo-Carrasco, R.; Acevedo, A.; Alvarez, J; Kallio, H. 2009. Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) grain, extrudate and bran. Plant Foods Human Nutrition 64:94-101.
- Rodríguez, I.; Wangensteen, R.; Atucha, N.; O'Valle, F.; Del Moral, R.; García, J.; Vargas, F; Osuna, A. 2003. Effects of omapatrilat on blood pressure and renal injury in L-NAME and L-NAME plus DOCA-treated rats. American Journal of hypertension 16:33-38.
- Rony, K; Ajith, T; Nima, N; Janardhanan, K. 2014. Hypolipidemic activity of *Phellinus rimosus* against triton WR-1339 and high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. Journal Environmental toxicology and pharmacology 37:482–492.

- Roslan, J; Faezah, K; Abdullah, N; Mustapa, S. 2014. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. Agriculture and Agricultural Science Procedia 2:312-319.
- Ruiz-Giménez, P; Burguete, M; Castello'-Ruiz, M; Marcos, J; Salom, J; Valles, S; Torregrosa, G; Alborch, E; Manzanares, P. 2010. Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on ACE-dependent vasoconstriction. International Dairy Journal 17:1212–1215.
- Saadi, S; Saari, N; Anwar, F; Abdul, A; Mohd, H. 2015. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. Journal Biotechnology Advances 33:80-116.
- Saito, K; Jin, D; Ogawa, T; Muramoto, K; Hatakeyama, E; Yasuhara, T. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:3668-3674.
- Schoenlechner, R; Siebenhandl, S; Berghofer, E. 2008. Pseudocereals. In: Arendt, E.K., Bello, F.D. Editors. Gluten-free cereal products and beverages. Academic Press. Chapter 7. 149-190.
- Segura, M; Chel, L; Betancur, D. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Revista chilena de nutrición 37(3):386-391.
- Segura-Campos, M; Chel, L; Betancur, D. 2013. Bioactividad de peptidos derivados de proteínas alimentarias. Mexico. Editorial OmniaScience.
- Serna, M; Wong, C; Santiago, J; Baeza, I, Wong, C. 2015. Hypocholesterolemic and choleric effects of three dimethoxycinnamic acids in relation to 2,4,5-trimethoxycinnamic acid in rats fed with a high-cholesterol/cholate diet. Pharmacological Reports 67:553-559.

- Sharifi, A; Akbarloo, N; Darabi, R. 2005. Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME induced hypertension. *Pharmacological Research* 52:438–444.
- Sharp, P; Villano, J. 2013. *The laboratory rat*. EE.UU. 2 ed. Vol 4. CRC Press.
- Silvia, R. 2006. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Revista Biomédica* 2(3):252-256.
- Singh, G. 2016. *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden into Value-Added Products*. Academic Press. Elsevier Inc.
- Siow, H; Gan, G. 2013. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Journal Food Chemistry* 141:3435–3442.
- Sirtori, C.R.; Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Castiglioni, S.; Duranti, M.; Magni, C; Morandi, S.; D'Agostina, A.; Arnoldi, A. 2004. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *Journal of Nutrition*. 134:18–23.
- Soares de Castro, R; Sato, H. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74:185-198.
- Soca, P. 2009. Dislipidemias. *ACI Medical*. (6):265-273.
- Tapia, M. 1990. *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación*. Santiago de Chile, Chile. 2 ed. Editorial FAO.
- Tapia, M; Fries, A. 2007. *Guía de Campo de los Cultivos Andinos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú (ANPE). Lima, Perú

- Torok J. 2008. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiological Research* 57(6):813- 825.
- Torruco, J; Chel, L; Martínez, A; Dávila, G; Betancur, D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Science and Technology* 42:1597-1604.
- Udenigwe, C; Aluko, E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science* 71(1):11-24.
- Udenigwe, C; Mohan A. 2014. Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *Journal of Functional Foods* 8:45-52.
- Uhlig, T; Kyprianou, T; Martinelli, F.G; Oppici, C.A; Heiligers, D; Hills, D. 2014. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EUPA Open Proteomics* 4:58–69.
- Ukeda, H; Kaewana, D; Maeda, S; Sawamura, M. 1998. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine – xanthine oxidase. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63(3):485-488.
- Velásquez, M. 2017. Hidrólisis enzimática de la proteína de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) para obtener péptidos con propiedades antioxidante y antihipertensiva. Lima, Perú. Tesis Mg. Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
- Venereo, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*. 31(2): 126-133.
- Vercruyse, L; Van Camp, J; Smagghe, G. 2005. Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:8106-8115.

- Vioque, J; Millán, F. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. Sevilla, España. CTNCA.
- Voet, D. 2009. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular/ Voet, D; Voet, J; Pratt, C. 2 ed. Buenos Aires, Argentina. Medica Panamericana. 1264p
- 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 - Food Science and Technology* 75:93-99.
- Walsh, D; Berbard, H; Murray, B; MacDonald, J; Pentzien, A; Wright, G; Wal, J. 2004. *In vitro* generation and stability of the lactokinin  $\beta$ -lactoglobulin fragment. *Journal of Dairy Science* 87:3845-3857.
- Walters, R. 2013. Pseudocereals: Super Foods, or Pantry Hokum (en línea). Consultado 02 may 2017. Disponible en <http://open-furrow-agrosphere.net/Documents/UTW/Psuedocereals.pdf>.
- WHO (World Health Organization). 1999. International Society of hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines Subcommittee. *Journal Hypertension* 17(2):151-183.
- Wu, J; Ding, X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:501–506.
- Wu, J; Aluko, R; Muir, A. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography* 15:125-130.
- Yang, L; Chen, J; Xu, T; Nie, M; Yang, H. 2013. Hypocholesterolemic effect of rice protein is due to regulating hepatic cholesterol metabolism in adult rats. *Journal of Gene* 512:470-476.

- Yang, L., Kadowaki, M., 2009. Effects of rice proteins from two cultivars, Koshihikari and Shunyo, on hepatic cholesterol secretion by isolated perfused livers of rats fed cholesterol-enriched diets. *Annals Nutrition and Metabolism* 54:283–290.
- You, L; Zhao, M; Regenstein, J; Ren, J. 2011. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Journal of Food Chemistry* 124:188–194.
- Zeng, W; Sun, Q; Zhang, W; Liao, X; Shi, B. 2017. Antioxidant activity *in vivo* and biological safety evaluation of a novel antioxidante peptide from bovine hair hydrolysates. *Journal Process Biochemistry* 5:193-198.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: CURVAS ESTÁNDAR EMPLEADAS EN LA OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA

Determinación	X	Y
Proteína soluble $Y=1.8294 X + 0.0631$	Concentración de ASB (mg/mL)	Absorbancia
Actividad antioxidante ABTS $Y= 0.2664 X - 0.0179$	Concentración de equivalente trolox (mmol TE/L)	Absorbancia
Grado de hidrólisis $Y= 0.1526 X + 0.0241$	Concentración de Leucina (mmol/L)	Absorbancia

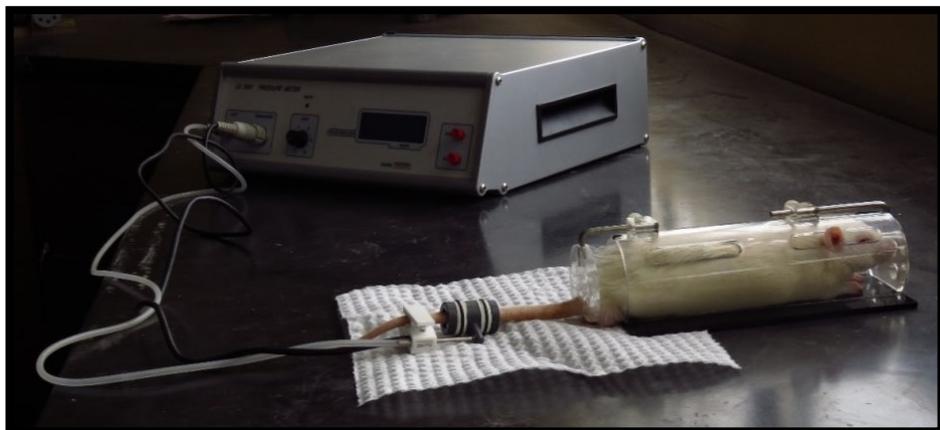
### ANEXO 2: PROTOCOLO NIBP PARA MEDIR LA PRESIÓN EN LA COLA DE RATAS

#### Procedimiento

1. Colocar a la rata dentro del inmovilizador a una temperatura ambiente de 30 a 32 °C y esperar que el animal esté tranquilo durante 5 minutos antes de iniciar la detección del pulso.
2. En la unidad de control del NIBP, seleccionar el botón de filtro de los animales en el panel trasero a "Rat".
3. Conectar el transductor y el esfigmomanómetro al dispositivo y luego colocar en la cola de la rata a la cuarta parte y mitad desde el final de la cola, respectivamente.
4. En la unidad de control del NIBP, fijar la perilla "GAIN2" en el valor máximo (10) y esperar unos 5 minutos, durante este tiempo la barra de la evolución del pulso mostrada en la pantalla tiene que ser muy errática, oscilando entre algún pulso y el mensaje "insufficient level".

5. Mantener al animal 3 minutos más y corregir la posición del esfigmomanómetro y del transductor si el animal los hubiese movido. Esperar 30 segundos a un minuto y mirar la evolución del pulso en la barra de evolución que se muestra en la unidad de control NIBP.
6. Si el pulso es todavía errático e insuficiente, esperar 3 minutos más.
7. Cuanto más al animal se habitúe y esté en un ambiente caliente, el pulso se irá haciendo progresivamente regular y la ganancia necesaria para obtener la señal será menor. De modo que se ajustará progresivamente a un menor valor de la ganancia (usando la perilla disponible en el panel frontal) para que la barra de evolución se mantenga en el rango correcto. El rango correcto será indicado por el mensaje "Pulse Level Ready".
8. Mantener el proceso hasta que se obtenga una señal con amplitud muy regular y estable con una ganancia fijada a 3 o menor. En ese momento, pulsar el botón "START" y se iniciará las mediciones. Las primeras medidas provocarán a veces una reacción exagerada del animal, pero después se habituará.
9. En las primeras mediciones es posible que el valor sistólico sea difícil de lograr, el dispositivo NIBP mostrará el mensaje "diastolic not found" o "Pressure > 300 mm Hg". En este caso, esperar un tiempo adicional de 2 minutos (o más) hasta que la señal de pulso sea completamente estable.

### **ANEXO 3: MEDICIÓN DE PRESIÓN EN LA COLA DE LA RATA**



#### ANEXO 4: COMPOSICIÓN DE DIETA ESTÁNDAR PARA RATAS

PPAB-UNALM	Porcentaje (%)
Materia seca	88.33
Proteína	20.00
Fibra	3.47
Grasa	7.48
Lisina	1.05
Metionina	0.51
Met-cist	0.86
Arginina	1.18
Treonina	0.77
Triptófano	0.28
Glicina	0.86
Glicina-serina	1.86
Histidina	0.52
Leucina	1.72
Isoleucina	0.84
Fenilalanina	0.97
Fenilalanina-tirosina	1.82
Valina	0.97
Fósforo total	0.50
Fósforo disponible	0.20
Calcio	0.60
Sodio	0.08
Ac. Linol.	3.70

FUENTE: Tomado de Planta Piloto de Alimentos Balanceados (s.f.)

**ANEXO 5: GANANCIA PESO DE RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

Tratamientos		Ganancia de peso (g)
Control	R 1	102.6
	R 2	92.4
	R 3	70.5
	R 4	80.1
	R 5	98.1
	R 6	84.6
	R 7	105.2
L-NAME + HPC	R 1	78.5
	R 2	78.2
	R 3	66.9
	R 4	80.3
	R 5	68.7
	R 6	79.1
	R 7	69.8
L-NAME + Captopril	R 1	84.8
	R 2	89.8
	R 3	72.1
	R 4	88.4
	R 5	65.1
	R 6	79.8
	R 7	74.0
L-NAME	R 1	95.6
	R 2	89.5
	R 3	78.6
	R 4	90.6
	R 5	90.9
	R 6	73.2
	R 7	74.8

## ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA GANANCIA DE PESO DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO

### Análisis de varianza para la ganancia de peso por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	993.341	3	331.1140	3.69	0.0258
Intra grupos	2154.330	24	89.7638		
Total (Corregido)	3147.670	27			

### Pruebas de Múltiple Rangos para ganancia por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
L-NAME + HPC	7	74.5000	X
L-NAME + captopril	7	79.1286	X
L-NAME	7	84.6857	XX
Control	7	90.3857	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME		5.70000
Control - L-NAME + HPC	*	15.88570
Control - L-NAME + captopril	*	11.25710
L-NAME - L-NAME + HPC		10.18570
L-NAME - L-NAME + captopril		5.55714
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril		-4.62857

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 7: PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

TRATAMIENTOS		PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (mmHg)					
		Día 0	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24	Día 30
Control	R 1	97	96	113	117	99	116
	R 2	121	115	102	102	100	111
	R 3	111	127	109	111	105	103
	R 4	111	107	115	102	106	105
	R 5	101	118	114	106	117	116
	R 6	104	119	98	102	111	99
	R 7	110	118	100	103	117	121
L-NAME + HPC	R 1	104	145	155	161	176	150
	R 2	107	133	136	145	155	153
	R 3	115	144	136	149	159	169
	R 4	118	146	133	155	154	175
	R 5	101	116	145	147	161	164
	R 6	115	143	136	147	147	162
	R 7	123	142	141	146	154	160

«continuación»

L-NAME + captopril	R 1	120	122	120	119	121	127
	R 2	102	105	120	117	119	122
	R 3	120	127	113	128	131	127
	R 4	114	114	109	130	120	119
	R 5	107	119	121	116	124	120
	R 6	122	124	118	116	127	123
	R 7	122	107	116	123	127	119
L-NAME	R 1	123	146	165	177	181	183
	R 2	123	156	148	171	186	193
	R 3	117	153	154	166	185	183
	R 4	109	157	154	192	175	181
	R 5	113	156	149	159	177	172
	R 6	104	146	154	190	196	204
	R 7	124	144	161	191	204	176

## ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO

### Análisis de varianza multifactorial para la presión arterial sistólica para el estudio antihipertensivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	71538.20	3	23846.1000	369.32	0.0000
B:Tiempo	20203.80	5	4040.7500	62.58	0.0000
INTERACCIONES					
AB	17319.00	15	1154.6000	17.88	0.0000
RESIDUOS	9297.71	144	64.5675		
TOTAL (CORREGIDO)	118359.00	167			

### Pruebas de múltiple rango para la presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	42	108.929	1.23989	X
L-NAME +	42	119.452	1.23989	X
L-NAME + HPC	42	143.405	1.23989	X
L-NAME	42	161.857	1.23989	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-52.9286
Control - L-NAME + HPC	*	-34.4762
Control - L-NAME + captopril	*	-10.5238
L-NAME - L-NAME + HPC	*	18.4524
L-NAME - L-NAME + captopril	*	42.4048
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	23.9524

\* indica una diferencia significativa

## Pruebas de múltiple rango para la presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	28	112.786	1.51855	X
12	28	129.821	1.51855	X
6	28	130.179	1.51855	X
18	28	138.857	1.51855	X
24	28	144.071	1.51855	X
30	28	144.750	1.51855	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6	*	-17.392900
0 - 12	*	-17.035700
0 - 18	*	-26.071400
0 - 24	*	-31.285700
0 - 30	*	-31.964300
6 - 12		0.357143
6 - 18	*	-8.678570
6 - 24	*	-13.892900
6 - 30	*	-14.571400
12 - 18	*	-9.035710
12 - 24	*	-14.250000
12 - 30	*	-14.928600
18 - 24	*	-5.214290
18 - 30	*	-5.892860
24 - 30		-0.678571

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA CERO**

**Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tratamientos**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	298.714	3	99.5714	1.58	0.2191
Intra grupos	1508.000	24	62.8333		
Total (Corregido)	1806.710	27			

**ANEXO 10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO CONTROL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

**Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	300.50	5	60.1000	0.98	0.4424
Intra grupos	2204.29	36	61.2302		
Total (Corregido)	2504.79	41			

**ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

**Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25374.30	5	5074.8600	57.26	0.0000
Intra grupos	3190.86	36	88.6349		
Total (Corregido)	28565.10	41			

## Pruebas de Múltiple Rangos para la Presión Arterial Sistólica por Tiempo

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	7	116.143	X
6	7	151.143	X
12	7	155.000	X
18	7	178.000	X
24	7	186.286	X
30	7	184.571	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6	*	-35.00000
0 - 12	*	-38.85710
0 - 18	*	-61.85710
0 - 30	*	-68.42860
0 - 24	*	-70.14290
6 - 12		-3.85714
6 - 18	*	-26.85710
6 - 30	*	-33.42860
6 - 24	*	-35.14290
12 - 18	*	-23.00000
12 - 30	*	-29.57140
12 - 24	*	-31.28570
18 - 30		-6.57143
18 - 24		-8.28571
24 - 30		-1.71429

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + CAPTOPRIL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

**Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	460.69	5	92.1381	2.51	0.0474
Intra grupos	1319.71	36	36.6587		
Total (Corregido)	1780.40	41			

**Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial sistólica por tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	7	115.286	X
12	7	116.714	X
6	7	116.857	X
18	7	121.286	XX
30	7	122.429	XX
24	7	124.143	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6		-1.571430
0 - 12		-1.428570
0 - 18		-6.000000
0 - 24	*	-8.857140
0 - 30		-7.142860
6 - 12		0.142857
6 - 18		-4.428570
6 - 24	*	-7.285710
6 - 30		-5.571430
12 - 18		-4.571430

«continuación»

12 - 24	*	-7.428570
12 - 30		-5.714290
18 - 24		-2.857140
18 - 30		-1.142860
24 - 30		1.714290

\* indica una diferencia significativa.

### **ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + HPC EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

#### **Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11387.30	5	2277.450	31.74	0.0000
Intra grupos	2582.86	36	71.746		
Total (Corregido)	13970.10	41			

#### **Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial sistólica por tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	7	111.857	X
6	7	138.429	X
12	7	140.286	X
18	7	150.000	X
24	7	158.000	XX
30	7	161.857	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6	*	-26.57140
0 - 12	*	-28.42860
0 - 18	*	-38.14290
0 - 24	*	-46.14290
0 - 30	*	-50.00000
6 - 12		-1.85714
6 - 18	*	-11.57140
6 - 24	*	-19.57140
6 - 30	*	-23.42860
12 - 18	*	-9.71429
12 - 24	*	-17.71430
12 - 30	*	-21.57140
18 - 24		-8.00000
18 - 30	*	-11.85710
24 - 30		-3.85714

\* indica una diferencia significativa.

#### **ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA SEIS**

##### **Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6563.25	3	2187.750	27.39	0.0000
Intra grupos	1916.86	24	79.869		
Total (Corregido)	8480.11	27			

## Pruebas de múltiple rangos para presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	114.286	X
L-NAME + captopril	7	116.857	X
L-NAME + HPC	7	138.429	X
L-NAME	7	151.143	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-36.85710
Control - L-NAME + HPC	*	-24.14290
Control - L-NAME + captopril		-2.57143
L-NAME - L-NAME + HPC	*	12.71430
L-NAME - L-NAME + captopril	*	34.28570
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	21.57140

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 12

### Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9961.820	3	3320.6100	80.15	0.0000
Intra grupos	994.286	24	41.4286		
Total (Corregido)	10956.100	27			

## Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	107.286	X
L-NAME + captopril	7	116.714	X
L-NAME + HPC	7	140.286	X
L-NAME	7	155.000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-47.71430
Control - L-NAME + HPC	*	-33.00000
Control - L-NAME + captopril	*	-9.42857
L-NAME - L-NAME + HPC	*	14.71430
L-NAME - L-NAME + captopril	*	38.28570
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	23.57140

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 18

### Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	20889.20	3	6963.0800	104.08	0.0000
Intra grupos	1538.76	23	66.9027		
Total (Corregido)	22428.00	26			

## Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	106.143	X
L-NAME + captopril	7	121.286	X
L-NAME + HPC	7	150.000	X
L-NAME	7	178.000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-71.8571
Control - L-NAME + HPC	*	-43.8571
Control - L-NAME + captopril	*	-15.1429
L-NAME - L-NAME + HPC	*	28.0000
L-NAME - L-NAME + captopril	*	56.7143
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	28.7143

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 24

### Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25792.70	3	8597.570	129.52	0.0000
Intra grupos	1593.14	24	66.381		
Total (Corregido)	27385.90	27			

## Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	107.857	X
L-NAME + captopril	7	124.143	X
L-NAME + HPC	7	158.000	X
L-NAME	7	186.286	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME + HPC	*	-50.1429
Control - L-NAME + captopril	*	-16.2857
Control - L-NAME	*	-78.4286
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	33.8571
L-NAME + HPC - L-NAME	*	-28.2857
L-NAME + captopril - L-NAME	*	-62.1429

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 30

### Análisis de varianza para la presión arterial sistólica por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25020.10	3	8340.0400	124.39	0.0000
Intra grupos	1609.14	24	67.0476		
Total (Corregido)	26629.30	27			

## Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial sistólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	110.143	X
L-NAME + captopril	7	122.429	X
L-NAME + HPC	7	161.857	X
L-NAME	7	184.571	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME + HPC	*	-51.7143
Control - L-NAME + captopril	*	-12.2857
Control - L-NAME	*	-74.4286
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	39.4286
L-NAME + HPC - L-NAME	*	-22.7143
L-NAME + captopril - L-NAME	*	-62.1429

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 19: PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE LAS RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

TRATAMIENTOS		PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (mm Hg)					
		Día 0	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24	Día 30
Control	R 1	73	67	93	85	73	90
	R 2	93	85	76	80	67	92
	R 3	84	89	96	81	68	70
	R 4	81	66	93	74	63	87
	R 5	74	93	98	71	90	80
	R 6	81	71	73	68	79	61
	R 7	65	84	71	76	79	83
L-NAME + HPC	R 1	69	108	132	141	158	130
	R 2	69	97	123	129	132	140
	R 3	88	90	118	112	121	142
	R 4	81	126	116	144	140	153
	R 5	65	92	133	103	136	141
	R 6	81	119	101	122	125	143
	R 7	96	96	120	129	125	122

«continuación»

L-NAME + captopril	R 1	92	98	107	101	104	109
	R 2	63	86	95	90	88	111
	R 3	100	114	94	109	115	88
	R 4	74	93	85	106	100	99
	R 5	86	83	108	101	103	77
	R 6	77	92	98	95	87	89
	R 7	84	81	100	95	94	89
L-NAME	R 1	94	130	143	124	149	162
	R 2	83	132	127	142	160	171
	R 3	75	139	123	128	152	154
	R 4	75	144	116	117	144	134
	R 5	84	117	129	120	120	127
	R 6	76	108	104	168	149	182
	R 7	87	105	142	163	168	155

## ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO

### Analisis de varianza multifactorial para la presión arterial diastólica para el estudio antihipertensivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos					
A:Tratamientos	63238.9	3	21079.600	138.60	0.0000
B:Tiempo	24703.7	5	4940.740	32.49	0.0000
INTERACCIONES					
AB	18423.5	15	1228.230	8.08	0.0000
RESIDUOS	21900.6	144	152.087		
TOTAL (CORREGIDO)	128267.0	167			

### Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial diastólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	42	79.1190	1.90293	X
L-NAME + captopril	42	94.2857	1.90293	X
L-NAME + HPC	42	116.8570	1.90293	X
L-NAME	42	129.0950	1.90293	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-49.9762
Control - L-NAME + HPC	*	-37.7381
Control - L-NAME + captopril	*	-15.1667
L-NAME - L-NAME + HPC	*	12.2381
L-NAME - L-NAME + captopril	*	34.8095
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	22.5714

\* indica una diferencia significativa.

## Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial diastólica por tiempo

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	28	80.3571	2.3306	X
6	28	100.1790	2.3306	X
12	28	107.6430	2.3306	X
18	28	109.7860	2.3306	X
24	28	113.8930	2.3306	XX
30	28	117.1790	2.3306	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6	*	-19.82140
0 - 12	*	-27.28570
0 - 18	*	-29.42860
0 - 24	*	-33.53570
0 - 30	*	-36.82140
6 - 12	*	-7.46429
6 - 18	*	-9.60714
6 - 24	*	-13.71430
6 - 30	*	-17.00000
12 - 18		-2.14286
12 - 24		-6.25000
12 - 30	*	-9.53571
18 - 24		-4.10714
18 - 30	*	-7.39286
24 - 30		-3.28571

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 21: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA CERO**

**Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	89.8571	3	29.9524	0.29	0.8305
Intra grupos	2458.5700	24	102.4400		
Total (Corregido)	2548.4300	27			

**ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA SEIS**

**Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7890.96	3	2630.320	15.58	0.0000
Intra grupos	4053.14	24	168.881		
Total (Corregido)	11944.10	27			

**Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial diastólica por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	79.2857	X
L-NAME + captopril	7	92.4286	XX
L-NAME + HPC	7	104.0000	X
L-NAME	7	125.0000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-45.7143
Control - L-NAME + HPC	*	-24.7143
Control - L-NAME + captopril		-13.1429
L-NAME - L-NAME + HPC	*	21.0000
L-NAME - L-NAME + captopril	*	32.5714
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril		11.5714

\* indica una diferencia significativa.

### **ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 12**

#### **Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7575.00	3	2525.000	19.78	0.0000
Intra grupos	3063.43	24	127.643		
Total (Corregido)	10638.40	27			

#### **Pruebas de múltiple rangos para presión arterial diastolica por tratamientos**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	85.7143	X
L-NAME + captopril	7	98.1429	X
L-NAME + HPC	7	120.4290	X
L-NAME	7	126.2860	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-40.57140
Control - L-NAME + HPC	*	-34.71430
Control - L-NAME + captopril		-12.42860
L-NAME - L-NAME + HPC		5.85714
L-NAME - L-NAME + captopril	*	28.14290
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	22.28570
L-NAME - L-NAME + captopril	*	28.14290
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	22.28570

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 18

### Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	15644.10	3	5214.710	28.52	0.0000
Intra grupos	4388.57	24	182.857		
Total (Corregido)	20032.70	27			

### Pruebas de múltiple rangos para presión arterial diastólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	76.4286	X
L-NAME + captopril	7	99.5714	X
L-NAME + HPC	7	125.7140	X
L-NAME	7	137.4290	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME	*	-61.0000
Control - L-NAME + HPC	*	-49.2857
Control - L-NAME + captopril	*	-23.1429
L-NAME - L-NAME + HPC		11.7143
L-NAME - L-NAME + captopril	*	37.8571
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	26.1429

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 24

### Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	24020.7	3	8006.89	56.39	0.0000
Intra grupos	3408.0	24	142.00		
Total (Corregido)	27428.7	27			

### Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial diastólica por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	74.1429	X
L-NAME + captopril	7	98.7143	X
L-NAME + HPC	7	133.8570	X
L-NAME	7	148.8570	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME + HPC	*	-59.7143
Control - L-NAME + captopril	*	-24.5714
Control - L-NAME	*	-74.7143
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	35.1429
L-NAME + HPC - L-NAME	*	-15.0000
L-NAME + captopril - L-NAME	*	-50.1429

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO EN EL DÍA 30**

**Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	26291.30	3	8763.750	46.44	0.0000
Intra grupos	4528.86	24	188.702		
Total (Corregido)	30820.10	27			

**Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial diastólica por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	7	80.4286	X
L-NAME + captopril	7	94.5714	X
L-NAME + HPC	7	138.7140	X
L-NAME	7	155.0000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - L-NAME + HPC	*	-58.2857
Control - L-NAME + captopril		-14.1429
Control - L-NAME	*	-74.5714
L-NAME + HPC - L-NAME + captopril	*	44.1429
L-NAME + HPC - L-NAME	*	-16.2857
L-NAME + captopril - L-NAME	*	-60.4286

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 27: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO CONTROL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

**Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	541.833	5	108.3670	1.10	0.3768
Intra grupos	3542.570	36	98.4048		
Total (Corregido)	4084.400	41			

**ANEXO 28: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

**Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	23615.6	5	4723.120	18.78	0.0000
Intra grupos	9056.0	36	251.556		
Total (Corregido)	32671.6	41			

**Pruebas de múltiple rangos para presión arterial diastólica por tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	7	82.000	X
6	7	125.000	X
12	7	126.286	X
18	7	137.429	XX
24	7	148.857	X
30	7	155.000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6	*	-43.00000
0 - 12	*	-44.28570
0 - 18	*	-55.42860
0 - 24	*	-66.85710
0 - 30	*	-73.00000
6 - 12		-1.28571
6 - 18		-12.42860
6 - 24	*	-23.85710
6 - 30	*	-30.00000
12 - 18		-11.14290
12 - 24	*	-22.57140
12 - 30	*	-28.71430
18 - 24		-11.42860
18 - 30		-17.57140
24 - 30		-6.14286

\* indica una diferencia significativa.

## **ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + CAPTOPRIL EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

### **Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1469.71	5	293.943	2.79	0.0315
Intra grupos	3796.86	36	105.468		
Total (Corregido)	5266.57	41			

## Pruebas de múltiple rangos para presión arterial diastólica por tiempo

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	7	82.2857	X
6	7	92.4286	XX
30	7	94.5714	X
12	7	98.1429	X
24	7	98.7143	X
18	7	99.5714	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6		-10.142900
0 - 12	*	-15.857100
0 - 18	*	-17.285700
0 - 24	*	-16.428600
0 - 30	*	-12.285700
6 - 12		-5.714290
6 - 18		-7.142860
6 - 24		-6.285710
6 - 30		-2.142860
12 - 18		-1.428570
12 - 24		-0.571429
12 - 30		3.571430
18 - 24		0.857143
18 - 30		5.000000
24 - 30		4.142860

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA DE RATAS DEL TRATAMIENTO L-NAME + HPC EN EL ESTUDIO ANTIHIPERTENSIVO**

**Análisis de varianza para la presión arterial diastólica por tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17500.00	5	3500.000	22.89	0.0000
Intra grupos	5505.14	36	152.921		
Total (Corregido)	23005.10	41			

**Pruebas de múltiple rangos para la presión arterial diastólica por tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	7	78.4286	X
6	7	104.0000	X
12	7	120.4290	X
18	7	125.7140	XX
24	7	133.8570	XX
30	7	138.7140	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 6	*	-25.57140
0 - 12	*	-42.00000
0 - 18	*	-47.28570
0 - 24	*	-55.42860
0 - 30	*	-60.28570
6 - 12	*	-16.42860
6 - 18	*	-21.71430
6 - 24	*	-29.85710
6 - 30	*	-34.71430

«continuación»

12 - 18		-5.28571
12 - 24		-13.42860
12 - 30	*	-18.28570
18 - 24		-8.14286
18 - 30		-13.00000
24 - 30		-4.85714

\* indica una diferencia significativa.

### ANEXO 31: GANANCIA DE PESO DE RATAS DURANTE EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO Y ANTIOXIDANTE

Tratamientos		Ganancia de peso (g)
Control	R 1	117
	R 2	121
	R 3	166
	R 4	125
	R 5	82
	R 6	113
HCD + HPC	R 1	133
	R 2	131
	R 3	138
	R 4	132
	R 5	119
	R 6	108
HCD + atorvastatina	R 1	73
	R 2	165
	R 3	142
	R 4	140
	R 5	137
	R 6	113
HCD	R 1	150
	R 2	157
	R 3	143
	R 4	166
	R 5	161
	R 6	114

**ANEXO 32: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA GANANCIA DE PESO DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO Y ANTIOXIDANTE**

**Análisis de varianza para la ganancia de peso por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2434.0	3	811.334	1.40	0.2747
Intra grupos	11044.9	19	581.309		
Total (Corregido)	13478.9	22			

**ANEXO 33: PERFIL LIPÍDICO EN EL SUERO DE LAS RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLEMICO**

TRATAMIENTOS		CT (mg/dL)	TT (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)	C-VLDL (mg/dL)
Control	R 1	94	88	56	20	18
Control	R 2	66.5	79	41	9.5	16
Control	R 3	95	90	49	28	18
Control	R 4	85.2	85.7	48.7	19.2	17.3
HDC + HPC	R 1	121	58.5	46	63	12
HDC + HPC	R 2	91	94	41	31	19
HDC + HPC	R 3	107.5	94.5	34	54.5	19
HDC + HPC	R 4	106.5	82.3	40.3	49.5	16.7
HDC + Atorvastatina	R 1	99.5	104.5	49	30	20.5
HDC + Atorvastatina	R 2	114	108	51	41.5	21.5
HDC + Atorvastatina	R 3	112	125.5	43	44	25
HDC + Atorvastatina	R 4	108.5	112.7	47.7	38.5	22.3
HDC	R 1	144	154.5	39	74.5	30.5
HDC	R 2	123	82.5	59	47.5	16.5
HDC	R 3	126.5	114.5	62	41.5	23
HDC	R 4	131.2	117.2	53.3	54.5	23.3

**ANEXO 34: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL TOTAL (CT) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO**

**Análisis de varianza para el CT por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4241.82	3	1413.940	12.56	0.0005
Intra grupos	1351.34	12	112.611		
Total (Corregido)	5593.16	15			

**Pruebas de múltiple rangos para el CT por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	85.175	X
HCD + HPC	4	106.500	X
HCD + Atorvastatina	4	108.500	X
HCD	4	131.175	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - HCD	*	-46.000
Control - HCD + Atorvastatina	*	-23.325
Control - HCD + HPC	*	-21.325
HCD - HCD + Atorvastatina	*	22.675
HCD - HCD + HPC	*	24.675
HCD + Atorvastatina - HCD + HPC		2.000

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 35: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRIGLICÉRIDOS TOTALES (TT)  
DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO**

**Análisis de varianza para los TT por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3888.37	3	1296.120	4.12	0.0318
Intra grupos	3776.67	12	314.723		
Total (Corregido)	7665.04	15			

**Pruebas de múltiple rangos para los TT por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HCD + HPC	4	82.325	X
Control	4	85.675	XX
HCD + Atorvastatina	4	112.675	XX
HCD	4	117.175	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - HCD	*	-31.50
Control - HCD + Atorvastatina		-27.00
Control - HCD + HPC		3.35
HCD - HCD + Atorvastatina		4.50
HCD - HCD + HPC	*	34.85
HCD + Atorvastatina - HCD + HPC	*	30.35

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 36: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL-HDL (C-HDL) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO**

**Análisis de varianza para el C-HDL por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	347.29	3	115.7630	2.61	0.0998
Intra grupos	532.67	12	44.3892		
Total (Corregido)	879.96	15			

**Pruebas de múltiple rangos para el C-HDL por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HCD + HPC	4	40.325	X
HCD + Atorvastatina	4	47.675	XX
Control	4	48.675	XX
HCD	4	53.325	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - HCD		-4.65
Control - HCD + Atorvastatina		1.00
Control - HCD + HPC		8.35
HCD - HCD + Atorvastatina		5.65
HCD - HCD + HPC	*	13.00
HCD + Atorvastatina - HCD + HPC		7.35

\* indica una diferencia significativa

**ANEXO 37: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL-LDL (C – LDL) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO**

**Análisis de varianza para el C- LDL por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2942.92	3	980.972	8.11	0.0032
Intra grupos	1451.17	12	120.931		
Total (Corregido)	4394.08	15			

**Pruebas de múltiple rangos para el C-LDL por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	19.2	X
HCD + Atorvastatina	4	38.5	X
HCD + HPC	4	49.5	X
HCD	4	54.5	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control – HCD	*	-35.325
Control - HCD + Atorvastatina	*	-19.325
Control - HCD + HPC	*	-30.325
HCD - HCD + Atorvastatina		16.000
HCD - HCD + HPC		5.000
HCD + Atorvastatina - HCD + HPC		-11.000

\* indica una diferencia significativa

**ANEXO 38: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COLESTEROL-VLDL (C-VLDL) DE RATAS EN EL ESTUDIO HIPOCOLESTEROLÉMICO**

**Análisis de varianza para el C-VLDL por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	138.568	3	46.1892	3.83	0.0390
Intra grupos	144.670	12	12.0558		
Total (Corregido)	283.238	15			

**Pruebas de múltiple rangos para C-VLDL por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HCD + HPC	4	16.675	X
Control	4	17.325	XX
HCD + Atorvastatina	4	22.325	XX
HCD	4	23.325	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control - HCD	*	-6.00
Control - HCD + Atorvastatina		-5.00
Control - HCD + HPC		0.65
HCD - HCD + Atorvastatina		1.00
HCD - HCD + HPC	*	6.65
HCD + Atorvastatina - HCD + HPC	*	5.65

\* indica una diferencia significativa

**ANEXO 39: ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA EN EL SUERO DE LAS RATAS DURANTE EL ESTUDIO ANTIOXIDANTE**

TRATAMIENTOS		U SOD/mg proteina
Control	R 1	1.83
Control	R 2	1.48
Control	R 3	1.87
Control	R 4	1.77
Control	R 5	1.69
Control	R 6	1.60
HDC + HPC	R 1	1.91
HDC + HPC	R 2	1.87
HDC + HPC	R 3	1.88
HDC + HPC	R 4	1.74
HDC + HPC	R 5	1.39
HDC + HPC	R 6	1.77
HDC + atorvastatina	R 1	1.80
HDC + atorvastatina	R 2	1.79
HDC + atorvastatina	R 3	1.99
HDC + atorvastatina	R 4	1.58
HDC + atorvastatina	R 5	1.77
HDC + atorvastatina	R 6	2.25
HDC	R 1	1.26
HDC	R 2	1.49
HDC	R 3	1.52
HDC	R 4	1.51
HDC	R 5	1.34
HDC	R 6	1.40

**ANEXO 40: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) DE RATAS EN EL ESTUDIO ANTIOXIDANTE**

**Análisis de varianza para la actividad de SOD por tratamiento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.648583	3	0.2161940	7.03	0.0021
Intra grupos	0.614667	20	0.0307333		
Total (Corregido)	1.263250	23			

**Pruebas de múltiple rangos para la actividad de SOD por tratamiento**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HCD	6	1.42000	X
Control	6	1.70667	X
HCD + HPC	6	1.76000	X
HCD + Atorvastatina	6	1.86333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Control – HCD	*	0.2866670
Control - HCD + HPC		-0.0533333
Control - HCD + Atorvastatina		-0.1566670
HCD - HCD + HPC	*	-0.3400000
HCD - HCD + Atorvastatina	*	-0.4433330
HCD + HPC - HCD + atorvastatina		-0.1033330

\* indica una diferencia significativa